



## تأثیر تمرین هوازی و مکمل‌گیری ویتامین D بر میزان Fas و c-FLIP کبدی رت‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه

حمیدرضا اعتمادی<sup>۱</sup>، سجاد ارشادی<sup>۲\*</sup>، عبدالعلی بنایی فر<sup>۳</sup>، محمدعلی آذربایجانی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکترا- گروه فیزیولوژی ورزش- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب- تهران- ایران.

۲- استادیار- گروه فیزیولوژی ورزش- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب- تهران- ایران.

۳- دانشیار- گروه فیزیولوژی ورزش- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب- تهران- ایران.

۴- استاد- گروه فیزیولوژی ورزش- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی- تهران- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۶

### چکیده

**مقدمه:** هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر تمرین هوازی منظم و مصرف ویتامین D بر آپوپتوز کبدی در موش‌های صحرایی قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه بود.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با میانگین وزن  $220 \pm 20$  گرم به‌طور تصادفی به ده گروه ۶ تایی شامل: گروه شاهد (C)، آب اکسیژنه (H)، آب اکسیژنه دو برابر (2H)، آب اکسیژنه + مکمل‌گیری ویتامین D (HD)، آب اکسیژنه دو برابر + مکمل‌گیری ویتامین D3 (D3H)، آب اکسیژنه + تمرین ورزشی (HE)، آب اکسیژنه دو برابر + تمرین ورزشی (2HE)، آب اکسیژنه + مکمل‌گیری ویتامین D3 + تمرین ورزشی (D3HE)، آب اکسیژنه دو برابر + مکمل‌گیری ویتامین D3 + تمرین ورزشی (D3HDE)، آب اکسیژنه دو برابر + مکمل‌گیری ویتامین D3 + تمرین ورزشی (2HDE) و دی‌متیل‌سولفواکساید+سالین (DMSO) تقسیم شدند. پس از آن، حیوانات به مدت ۸ هفته تحت مداخلات القا استرس اکسیداتیو (تزریق درون صفاقی H2O2 به‌صورت ۳ بار در هفته)، مصرف ویتامین D (به‌صورت تزریق روزانه درون صفاقی) و ورزش روزانه نوارگردان (مدت هر جلسه تمرین ۳۰ الی ۶۰ دقیقه، با سرعت ۸ الی ۲۰ متر/دقیقه) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌های صحرایی قربانی شدند و بافت کبد استخراج گردید و میزان غلظت پروتئین‌های Fas و c-FLIP با استفاده از روش الیزا اندازه‌گیری شد. جهت مقایسه متغیرها بین گروه‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس یک راه استفاده شد.

**نتایج:** یافته‌ها نشان داد که میزان پروتئین Fas در گروه‌های H، 2H، HD و 2HD در مقایسه با گروه کنترل بیشتر ( $P < 0/0027$ ) و میزان پروتئین c-FLIP در گروه‌های H و 2H در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ( $P < 0/0018$ ). همچنین، گروه‌های 2HE و 2HDE در مقایسه با گروه 2H میزان کمتری از پروتئین Fas را نشان دادند ( $P < 0/0027$ ). علاوه، گروه HE در مقایسه با گروه H و گروه‌های 2HE و 2HDE در مقایسه با گروه 2H میزان بیشتری از پروتئین c-FLIP را نشان دادند ( $P < 0/0018$ ).

**نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قرار دادن موش‌های صحرایی در معرض آب اکسیژنه آبخار آپوپتوزی را در بافت کبد راه‌اندازی می‌کند. با این حال، ورزش منظم نوارگردان توانست تا حدود زیادی این اثر را تعدیل نماید اما مصرف مکمل ویتامین D چنین اثری به دنبال نداشت.

### واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، Fas، c-FLIP، کبد، تمرین هوازی، ویتامین D.

\*نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزش، تلفن: ۰۹۱۲۸۱۱۲۵۷۳، نمابر: ۰۲۱۵۵۵۴۰۵۴.

Email: Arshadi.sajad@yahoo.com

**ارجاع:** اعتمادی حمیدرضا، ارشادی سجاد، بنایی فر عبدالعلی، آذربایجانی محمدعلی. تأثیر تمرین هوازی و مکمل‌گیری ویتامین D بر میزان Fas و c-FLIP کبدی رت‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛ ۱۵(۴): ۲۷-۲۰.

## مقدمه

سلول‌ها وجود دارند، آغاز می‌شود. در این مسیر، اتصال Fas، TNF- $\alpha$  یا TRAIL به گیرنده‌های خود می‌تواند از طریق هیدرولیز خودکار، پروکاسپاز-8 را به کاسپاز-8 تبدیل نماید. کاسپاز-8 فعال شده می‌تواند کاسپاز-3 را فعال کرده و آپوپتوز را القا نماید. مولکول متفاوتی به نام c-FLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein) مسیر خارجی مرگ سلولی را از طریق Fas مهار می‌کند. c-FLIP شبیه پروکاسپاز 8 است، اما مکان فعال پروتئازی را ندارد. بنابراین، اگر چه کمپلکس پیام‌رسانی Fas را به خدمت می‌گیرد، اما پیام مرگ را منتقل نمی‌کند (۹).

حضور در فعالیت‌های ورزشی پیامدهای سودمندی به دنبال دارد که از آن جمله می‌توان به اثر آن بر کبد و متقابلاً نقش جدایی ناپذیر 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 بازمی‌گردد. 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).

از طرف دیگر، مطالعات سودمندی ویتامین D بر سلامت کبد را نشان داده‌اند. مطالعات اخیر، ارتباط بین کمبود ویتامین D3 و میزان وقوع بیماری‌های کبدی را گزارش نموده‌اند (۱۵ و ۱۶). ویتامین D به طور عمده در پوست از طریق تبدیل فتوشیمیایی 7-دهیدروکلیسترول به ویتامین D3 (کوله کلسیفرول) تولید می‌شود و با هیدروکسیلاسیون متوالی در کبد و کلیه‌ها به فرم فعال خود یعنی D3 یا 1,25-dihydroxyvitamin-1,25 یا کلسیتریول تبدیل می‌گردد و سرانجام با اتصال به گیرنده‌های خود اثرات فیزیولوژیک گسترده‌ای را در سلول‌ها اعمال می‌کند. ویتامین D به عنوان یک تعدیل‌کننده 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

اکثر بیماری‌های مزمن با عدم تعادل بین تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه هستند که منجر به انحراف از حالت پایدار می‌شوند. این روند استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود (۱). ROS به‌طور 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 ازن 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 به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان 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 مواجهه ی بعدی با سطوح بالاتر  $H_2O_2$  را افزایش می‌دهد (۵). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که القای سطوح پایین  $H_2O_2$  باعث افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو (۵ و ۶) در رت‌ها می‌شود. 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 برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) در سلول‌های کبدی افزایش یافته و بافت را دچار آسیب می‌کند (۷). آپوپتوز روشی طبیعی در سلول‌ها می‌باشد که در هموستاز بافتی و حذف سلول‌های آسیب دیده 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 (Extrinsic pathway) و درونی (Intrinsic pathway) رخ می‌دهد. مسیر داخلی که با عنوان مسیر میتوکندریایی نیز شناخته می‌شود، از طریق سیگنال‌هایی مانند رادیکال‌های آزاد (Free radicals) در درون سلول آغاز می‌شود و به‌واسطه پروتئین‌های خانواده Bcl-2 (B-cell leukemia 2 family proteins) موجود در غشای خارجی میتوکندری، با آسیب به غشای میتوکندری و رهایی سیتوکروم C موجب فعال شدن کاسپازها و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. مسیر خارجی با تحریک گیرنده‌های مرگ که در غشای خارجی اغلب

۱۸) و موش‌های صحرایی گروه‌های 2H، 2HE، 2HD و 2HDE تزریق درون صفاقی آب اکسیژنه را با دوز ۲ میلی‌مول به ازای هر کیلوگرم از وزن بدنشان (۱۸ و ۱۹) به صورت ۳ بار در هفته در روزهای زوج دریافت کردند (۵).

تزریق درون صفاقی ویتامین D3 در گروه‌های HD، 2HD، HDE و 2HDE به این صورت بود که رت‌ها ۰/۵ میکروگرم ویتامین D3 (آمپول ویتامین D3 با نام تجاری DITHRECOL شرکت کاسپین ویتامین؛ تهران، ایران) را به صورت تزریق روزانه درون صفاقی طی ۸ هفته دریافت کردند (۲۰). جهت رسیدن به دوز مناسب تزریقی از نرمال‌سالین برای رقیق کردن و از دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) جهت حل کردن ویتامین D3 در سالین استفاده شد. با توجه به لزوم بررسی تأثیر حلال مذکور یک گروه به نام DMSO تعریف شد که روزانه فقط حلال دریافت کردند.

موش‌های صحرایی گروه‌های HE، 2HE، HDE و 2HDE به طور روزانه فعالیت تمرینی منظم بر روی نوارگردان را به مدت ۸ هفته انجام دادند. موش‌های صحرایی در هفته اول با سرعت ۸ متر بر دقیقه و شیب ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه بر روی نوارگردان 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 موش‌های صحرایی در سرعت ۲۰ متر بر دقیقه با شیب ۱۰ درجه به مدت ۶۰ دقیقه در هر روز تمرین داده شدند (۲۱).

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه پروتکل تمرین، جهت اجتناب از سهم زیاد تولید ROS درون‌زا (۲۲) و بعد از ۱۲ ساعت گرسنگی، موش‌های صحرایی با استنشاق کلروفورم بیهوش و سپس به وسیله خون‌گیری مستقیم از قلب، قربانی شدند. بافت کبد به دقت جدا و بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور و منجمد شد و برای آزمایشات بعدی در دمای °C -۷۵ 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 مقادیر Fas و c-FLIP استفاده شد. میزان غلظت Fas در مایع رویی با استفاده از کیت الایزای ساخت شرکت Bioassay Technology Laboratory با شماره کاتالوگ E0213Ra و میزان غلظت c-FLIP در مایع رویی با استفاده از کیت الایزای ساخت شرکت Bioassay Technology Laboratory

آنالوگ‌های آن از اختلالات مذکور پیشگیری می‌کند (۱۷). اما نقش دقیق این ویتامین در کاهش آسیب‌های کبدی و به ویژه سازوکارهای مولکولی مسئول، همچنان با ناشناخته‌های 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، و عدم مطالعه اثرات احتمالی تمرینات ورزشی منظم بر عوامل مسیر خارجی آپوپتوز کبدی، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تمرین هوازی منظم و مکمل‌گیری ویتامین D بر میزان پروتئین‌های Fas و c-FLIP در بافت کبد رت‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه انجام می‌شود.

### مواد و روش‌ها

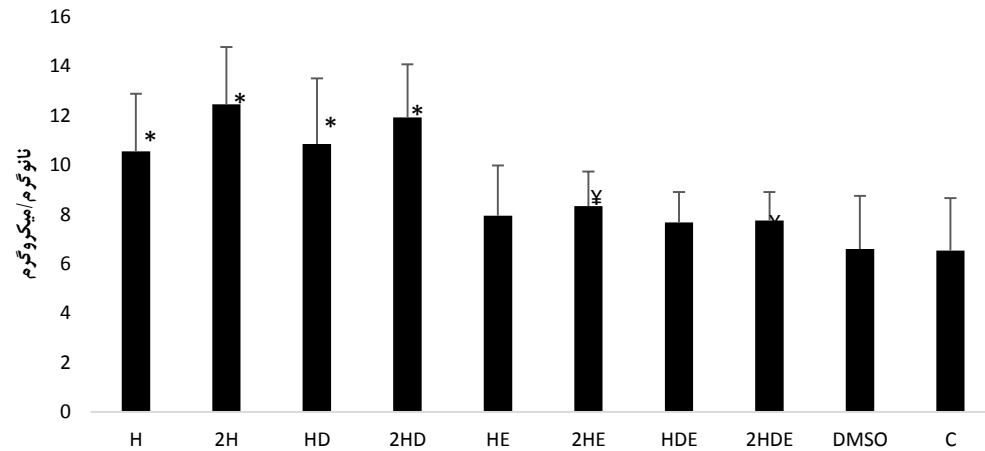
تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن  $20 \pm 220$  گرم و ۱۰-۸ هفته‌ای از مرکز حیوانات دانشگاه شیراز خریداری و به مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کرمان انتقال یافت و برای تحقیق حاضر استفاده شد. موش‌های صحرایی به طور تصادفی در قفس‌های ساخته شده از پلی پروپیلن، با اندازه  $16 \times 30 \times 42$  cm نگهداری شدند، بدین صورت که در هر قفس ۵ رت نگهداری می‌شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد و کنترل دمایی ( $22 \pm 2^\circ C$ ) و چرخه متناوب روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح و تاریکی از ساعت ۷ شب) نگهداری شدند. موش‌های صحرایی به طور آزادانه به آب و غذای ویژه موش‌های صحرایی (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.

موش‌های صحرایی به مدت دو هفته قبل از شروع پروتکل با محیط و نوارگردان (تردمیل) سازگار شدند. سپس، به طور تصادفی به ده گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه بندی شامل: گروه شاهد (C)، آب اکسیژنه (H)، آب اکسیژنه دو برابر (2H)، آب اکسیژنه + مکمل‌گیری ویتامین D (HD)، آب اکسیژنه دو برابر + مکمل‌گیری ویتامین D3 (2HD)، آب اکسیژنه + تمرین ورزشی (HE)، آب اکسیژنه دو برابر + تمرین ورزشی (2HE)، آب اکسیژنه + مکمل‌گیری ویتامین D3 + تمرین ورزشی (HDE)، آب اکسیژنه دو برابر + مکمل‌گیری ویتامین D3 + تمرین ورزشی (2HDE) و دی‌متیل سولفوکساید+سالین (DMSO) بود. پس از آن، حیوانات به مدت ۸ هفته تحت مداخلات القا استرس اکسیداتیو، مصرف ویتامین D3 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 (۵) و

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین میزان Fas در بافت کبد در گروه‌های H، HE، HD، 2H، 2HE، 2HD، DMSO، 2HDE و C تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.001$ ). بنابراین، برای تعیین منبع تفاوت‌ها از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. میزان بالای پروتئین Fas در گروه‌های H، 2H، HD و 2HD در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0.0027$ ). همچنین، گروه‌های 2HE و 2HDE در مقایسه با گروه 2H میزان کمتری از پروتئین Fas را در بافت کبد نشان دادند ( $P < 0.0027$ ) (نمودار ۱).

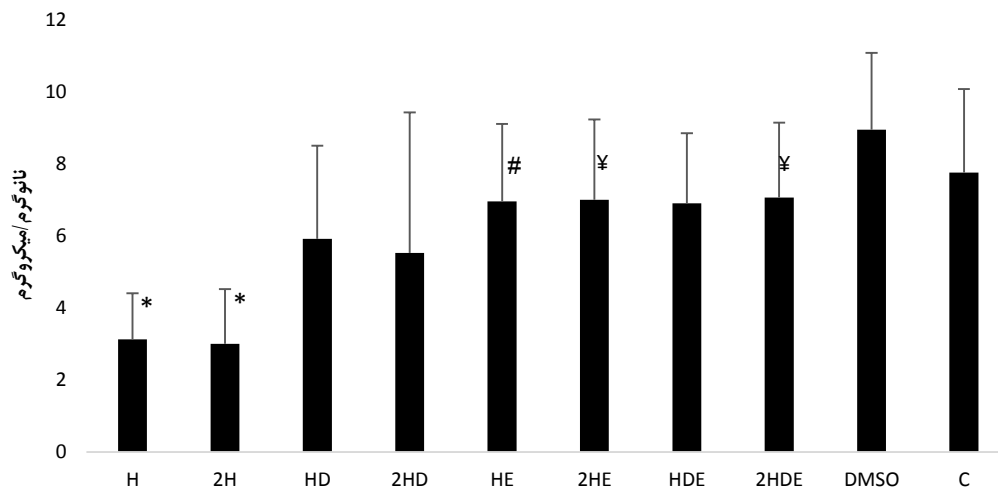
شماره کاتالوگ E1553Ra طبق دستورالعمل‌های کارخانه اندازه‌گیری شد. از نرم‌افزار SPSS برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لوین مورد بررسی قرار گرفت. سپس جهت مقایسه متغیرها بین گروه‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد و در صورت معنی‌داری آزمون تعقیبی بونفرونی به کار گرفته شد. سطح معنی‌داری برابر با  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج



نمودار ۱- میزان پروتئین Fas اندازه‌گیری شده با روش الایزا در بافت کبد

\* ( $P < 0.0027$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه کنترل  
 † ( $P < 0.0027$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه 2H



نمودار ۲- میزان پروتئین c-FLIP اندازه‌گیری شده با روش الایزا در بافت کبد

\* ( $P < 0.0018$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه کنترل  
 # ( $P < 0.0018$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه H  
 † ( $P < 0.0018$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه 2H

سرطان کبدی مشاهده شد. آنان بیان داشتند که اختلال در محور ویتامین D - گیرنده ویتامین D، که هم اتوفازی و هم آپوپتوز را تعدیل می‌کند، ممکن است دلیل این مشاهده باشد (۲۴). 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 (۲۵). دلایل این اختلاف در نتایج را می‌توان در دوز مصرفی 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 صحرایی قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه را تعدیل نماید، به طوری که، کاهش سطح پروتئین Fas و همچنین، افزایش سطح پروتئینی c-FLIP 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. 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 (۲۷). 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 دی‌آلدئید و کاسپازهای ۹، ۳، ۱۲ و ۸ کاهش یافت (۲۶).

تنظیم آپوپتوز بسیار پیچیده است و پروتئین‌های زیادی در مسیرهای فعال شدن آن دخیل هستند. اگرچه در پژوهش حاضر، مسیر داخلی آپوپتوز مورد توجه قرار نگرفت که از محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد، اما نتایج بسیاری از مطالعات پیشین حاکی از اثرات مثبت ورزش بر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از جمله سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پاراکسوناز-۱ و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند گلوتاتیون، اسید اوریک، بیلی‌روبین و یوبیکینون می‌باشد که در نهایت منجر به افزایش برداشت رادیکال‌های آزاد توسط آن‌ها و کاهش احتمال فعالیت آپوپتوزی می‌شود (۲۸ و ۲۹). به نظر می‌رسد که ورزش منظم می‌تواند

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین میزان c-FLIP در بافت کبد در گروه‌های H، HE، HD، HDE، 2H، 2HE، 2HD، 2HDE، DMSO و C تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $F=5/409$ ,  $P<0/001$ ). بنابراین، برای تعیین منبع تفاوت‌ها از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. میزان کمتر پروتئین c-FLIP در گروه‌های H و 2H در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $P<0/0018$ ). همچنین، گروه‌های HE در مقایسه با گروه H و گروه‌های 2HE و 2HDE در مقایسه با گروه 2H میزان بیشتری از پروتئین c-FLIP را در بافت کبد نشان دادند ( $P<0/0018$ ) (نمودار ۲).

### بحث

در تحقیق حاضر، تأثیر القای استرس اکسیداتیو برونزاد، تمرین هوازی منظم و مصرف ویتامین D بر سطوح پروتئین‌های Fas و c-FLIP کبدی در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. براساس یافته‌های این پژوهش، قرار گرفتن موش‌های صحرایی در معرض آب اکسیژنه با دوزهای ۱ و ۲ میلی‌مول/کیلوگرم موجب تنظیم مثبت آپوپتوز کبدی می‌شود، به طوری که میزان بالای پروتئین Fas و میزان کمتر پروتئین c-FLIP در گروه‌های H و 2H در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. قرار دادن موش‌های صحرایی در معرض آب اکسیژنه با دوز بالاتر (۲ میلی‌مول/کیلوگرم در برابر ۱ میلی‌مول/کیلوگرم) این آپوپتوز را به طور غیرمعنی‌دار افزایش داد. عدم وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های C و DMSO در میزان پروتئین‌های Fas و c-FLIP حاکی از این امر بود که تغییرات مشاهده شده در این متغیر و القای آپوپتوز ناشی از قرار گرفتن موش‌های صحرایی در معرض آب اکسیژنه بوده و روش القای آن (تزریقات متعدد) بی‌اثر است. این مشاهده می‌تواند به تعمیم یافته‌های حاصل 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 (۱۵ و ۱۶). ویتامین D می‌تواند تولید واسطه‌های ضد التهابی را ارتقا بخشد و به نظر می‌رسد که در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی نقش دارد (۲۳).

با این حال، در مطالعه حاضر تزریق روزانه درون صفاقی ویتامین D به موش‌های صحرایی قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه با دوزهای مختلف، تأثیری بر 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

- H2O2: role of modulation of vascular TP receptors and the heme oxygenase system. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:471-80.
7. Schattenberg JM, Schuchmann M. Diabetes and apoptosis: liver . *Apoptosis* 2009;14:1459-71. doi:10.1007/s10495-009-0366-2
  8. Karimi MN, 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. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2017;25:547-55.
  9. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO and Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *Journal of Cell Death* 2016;9:19-29. doi:10.4137/jcd.s39824
  10. 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;75:3117-28. doi:10.1016/j.lfs.2004.04.053
  11. 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;86:39-44. doi:10.1016/j.lfs.2009.11.003
  12. Bai J, Odin JA. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmunity Reviews* 2003;2:36-42. doi:10.1016/s1568-9972(02)00125-8
  13. 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;96:1776-81. doi:10.1152/jappphysiol.00795.2002
  14. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. *Pharmacology & Therapeutics* 2010;128:336-74. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.08.003
  15. Norman PE, Powell JT. Vitamin d and cardiovascular disease. *Circ Res* 2014;114:379-93. doi:10.1161/circresaha.113.301241
  16. Reddy Vanga S, Good M, Howard P A, Vacek J L. Role of vitamin d in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2010;106:798-805. doi:10.1016/j.amjcard.2010.04.042
  17. Przybylski R, McCune S, Hollis B, Simpson R U. Vitamin d deficiency in the spontaneously hypertensive lung failure [shhf] prone rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:641-6. doi:10.1155%2Fajpregu.00322.2013
  18. 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. doi: 10.1038/aja.2009.78
  19. Makino A, Skelton MM, Zou AP, Cowley AW. Increased renal medullary H2O2 leads to hypertension. *Hypertension* 2003;42:25-30. doi:10.1161/01.hyp.0000074903.96928.91
  20. Halder SK, Sharan C, Al-Hendy A. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 treatment shrinks uterine leiomyoma tumors in the Eker rat model. *Biol Reprod* 2012;86:116. doi:10.1095/biolreprod.111.098145
  21. Husain K, Hazelrigg SR. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:75-82. doi: 10.1016/s0925-4439(02)00070-4
  22. 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 Pharmacol Physiol* 2003;30:77-81. doi:10.1046/j.1440-1681.2002.03794.x
  23. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:404-12. doi:10.1038/ncprheum0855

سازگاری‌های آنزیمی را که مسئول کاهش استرس اکسایشی را بر عهده دارند، افزایش دهد. یکی از یافته‌های جدید مطالعه حاضر این است که تمرین ورزشی منظم قادر است با افزایش سطوح c-FLIP مسیر خارجی آپوپتوز را نیز کنترل نماید. c-FLIP مولکول اصلی مهارکننده مسیر خارجی آپوپتوز می‌باشد که با جلوگیری از فعال شدن کاسپاز-8 توسط کمپلکس پیام‌رسانی Fas، پیام مرگ و آپوپتوز را غیرفعال می‌کند (۹).

یکی دیگر از یافته‌های مطالعه حاضر این بود که تمرین هوازی منظم در ترکیب با مکمل ویتامین D توانست آپوپتوز کبدی موش‌های صحرایی 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 دوییدن روی نوارگردان بر شاخص آپوپتوز کبدی) می‌توان اینگونه بیان داشت که تنظیم منفی آپوپتوز کبدی در موش‌های صحرایی گروه‌های HDE و 2HDE ناشی از تمرین ورزشی بوده و مکمل‌گیری ویتامین D تأثیر چندانی بر آن نداشته است.

به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قرار دادن موش‌های صحرایی در معرض آب اکسیژنه موجب القای آپوپتوز در بافت کبد می‌شود. با این حال، ورزش منظم روی نوارگردان توانست تا حدود زیادی این اثر را تعدیل نماید اما مصرف مکمل ویتامین D چنین اثری به دنبال نداشت.

## تشکر و قدردانی

با تشکر از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب که مقدمات انجام این کار پژوهشی را فراهم نمودند.

## References

1. 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. doi: 10.1007/s00204-015-1579-5
2. 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. doi:10.1016/j.redox.2015.08.016
3. 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. doi:10.1155/2013/956792
4. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol* 2015;6:524-51. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020
5. Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2000;376:248-51. doi:10.1006/abbi.2000.1719
6. Puri N, Zhang F, Monu SR, Sodhi K, Bellner L, Lamon BD, et al. Antioxidants condition pleiotropic vascular responses to exogenous

24. Mohamed Ahmed Abdel-Mohsen, Ahlam Abd-Allah El-Braky, Abeer Abd El-Rahim Ghazal, Mohammed Mohammed Shamseya. Autophagy, apoptosis, vitamin D, and vitamin D receptor in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Medicine* 2018;97:e0172. doi: 10.1097/md.00000000000010172
25. Yu Zheng, Trupti Trivedi, Ruby CY Lin, Colette Fong-Yee, Rick Nolte, Jeline Manibo, 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* 2017;5:17023. doi:10.1038/boneres.2017.23
26. 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. doi:10.1155/2013/368450
27. 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;18:412-418.
28. Ufer C, Wang CC. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2011;4:1-14. doi:10.3389/fnmol.2011.00012
29. Mallikarjuna K, Shanmugam KR, Nishanth K, Wu MC, Hou CW, Kuo CH, Reddy KS. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol* 2010;44:523-9. doi:10.1016/j.alcohol.2010.07.004



## The Effect of Aerobic Exercise and Vitamin D Supplementation on Hepatic Fas and c-FLIP Levels in Rats Exposed to Oxygenated Water

Hamid Reza Etemadi (Ph.D. Student)<sup>1</sup>, Sajad Arshadi (Ph.D.)<sup>2\*</sup>, Abdolali Banaeifar (Ph.D.)<sup>3</sup>,  
Mohammadali Azarbayjani (Ph.D.)<sup>4</sup>

1- Dept. of Exercise Physiology, School of Human Sciences, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran.

2- Dept. of Exercise Physiology, School of Human Sciences, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran.

3- Dept. of Exercise Physiology, School of Human Sciences, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran.

4- Dept. of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 10 November 2020, Accepted: 14 February 2020

### Abstract:

**Introduction:** The aim of the present study was to investigate the effect of regular aerobic exercise and vitamin D supplementation on hepatic apoptosis in rats exposed to oxygenated water (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Methods:** For this purpose, 60 adult male Wistar rats weighed 220±20 g were randomly divided into ten groups (n=6 in each group) including: control group (C), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H), double H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2H), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Vitamin D<sub>3</sub> Supplement (HD), double H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Vitamin D<sub>3</sub> Supplement (2HD), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Exercise (HE), double H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Exercise (2HE), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Vitamin D<sub>3</sub> Supplement + Exercise (HDE), double H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Vitamin D<sub>3</sub> + Exercise (2HDE) and Dimethyl Sulfoxide + Saline (DMSO). Then, the animals were exposed to oxidative stress (intraperitoneal injection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 times a week), vitamin D<sub>3</sub> (intraperitoneal injection daily) and daily treadmill exercise for 8 weeks (duration of training sessions 30 to 60 min, at speeds of 8 to 20 m/min). The rats were sacrificed 24 hours after the last training session and liver tissue was extracted and Fas and c-FLIP protein concentration was measured by ELISA method. One-way ANOVA was used to compare the between groups differences.

**Results:** The results showed that Fas protein levels were higher in the H, 2H, HD and 2HD groups compared to the control group (P<0.05) and of c-FLIP protein level was lower in the H and 2H groups compared to the control group (P<0.05). The 2HE and 2HDE groups also showed less Fas protein level compared to the 2H group (P<0.05). In addition, the HE group compared to the H group and 2HE and 2HDE groups compared to the 2H group showed higher levels of c-FLIP protein concentration (P<0.05).

**Conclusion:** Overall, the results of the present study showed that exposure of rats to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> initiates apoptotic cascade in liver tissue. However, regular treadmill exercise was able to attenuate this effect to a large extent, but vitamin D<sub>3</sub> supplementation did not.

**Keywords:** Apoptosis; Fas; c-FLIP; Liver; Aerobic exercise; Vitamin D.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: S. Arshadi, Email: Arshadi.sajad@yahoo.com

**Citation:** Etemadi HR, Arshadi S, Banaeifar A, Azarbayjani M. The effect of aerobic exercise and vitamin D supplementation on hepatic Fas and c-FLIP levels in rats exposed to oxygenated water. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2021;15(4):20-27.