



تأثیر همزمان فعالیت تمرینی منظم و ویتامین D بر سطوح NF-κBp65 در رت‌های نر قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه

نعیمه محسنی‌زاده^۱، محمدعلی آذربایجانی^{۲*}، حمید نجفی‌پور^۳، حسن متین‌همایی^۴، عباسعلی کشتکار^۵

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- دانشجوی دکتری.

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

۳- دانشگاه علوم پزشکی کرمان- دانشکده پزشکی افضلی‌پور- مرکز تحقیقات فیزیولوژی- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی- استاد.

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

۵- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده پزشکی- گروه اپیدمیولوژی- استادیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۶

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو و التهاب نقش محوری در عملکرد قلب و اختلالات آن بازی می‌کنند و در مسیرهای سیگنالی مشترکی سهیم هستند. زیر واحد p65 عامل هسته‌ای کاپا B (NF-κBp65)، از نشانگران مهم التهاب میوکارد است. هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر همزمان فعالیت تمرینی منظم (E)، ویتامین D (VD) و القای استرس اکسیداتیو بر سطوح NF-κBp65 در میوکارد می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۶۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۱۰ گروه (n=۶) شامل: گروه شاهد، دریافت آب اکسیژنه (H₂O₂)، دریافت آب اکسیژنه دو برابر (2H₂O₂)، VD+H₂O₂، E+H₂O₂، E+2H₂O₂، E+VD+H₂O₂، E+VD+2H₂O₂ و دی‌متیل سولفوکساید+سالین تقسیم و به مدت ۸ هفته تحت پروتکل مداخله قرار گرفتند. سپس غلظت پروتئین NF-κBp65 با کیت الایزا اندازه‌گیری و با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس سه طرفه تحلیل شد. سطح معناداری برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که تمرین باعث افزایش غلظت پروتئین NF-κBp65 شد (P=۰/۰۴۹). تأثیر غلظت H₂O₂ نیز بر افزایش غلظت پروتئین NF-κBp65 معنادار بود (P=۰/۰۱۳). همچنین تعامل تمرین و VD اثر کاهنده بر غلظت پروتئین NF-κBp65 داشت (P=۰/۰۰۴). با این حال، اثر VD و تعامل تمرین با H₂O₂ بر غلظت پروتئین NF-κBp65 معنی‌دار نشد. همزمانی سه مداخله تمرین، VD و H₂O₂ نسبت به جمع اثر هر یک، اثری کاهنده بر غلظت پروتئین NF-κBp65 داشت (P=۰/۰۳۸).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که می‌توان از القای برون‌زاد استرس اکسیداتیو، فعالیت تمرینی منظم و مصرف VD جهت پیش‌آماده‌سازی و کاهش التهاب میوکارد در شرایط بالابودن استرس اکسیداتیو استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: التهاب میوکارد، استرس اکسیداتیو، NF-κBp65، VD، فعالیت تمرینی منظم.

*نویسنده مسئول: تهران، شهرک غرب ابتدای خیابان ایران زمین، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، گروه فیزیولوژی

ورزشی، تلفن: ۰۹۱۲۳۱۷۲۹۰۸، نمابر: ۰۲۱۸۸۵۶۱۲۸۲، Email: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

ارجاع: محسنی‌زاده نعیمه، آذربایجانی محمدعلی، نجفی‌پور حمید، متین‌همایی حسن، کشتکار عباسعلی. تأثیر همزمان فعالیت تمرینی منظم و ویتامین D بر سطوح NF-κBp65 در رت‌های نر قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۶؛ ۱۲(۳): ۵۵-۶۲.

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی (CVDs: Cardiovascular diseases) یکی از علل اصلی مرگ و میر و کاهش کیفیت زندگی در سراسر جهان است (۱). اکثر CVDs همراه با عدم تعادل بین تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS: Reactive oxygen species) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که باعث انحراف از حالت پایدار می‌شوند. این روند را استرس اکسیداتیو می‌نامند (۴-۱). آبشار نامطلوب اکسید احیا، استرس اکسیداتیو (۱ و ۴) و قرارگیری مزمن میوسیت‌ها در معرض ROS (۴) محرک‌های قوی در توسعه و بیماری‌زایی CVDs (۱ و ۴) از جمله افزایش فیبروز و هایپرتروفی قلبی و کاهش در عملکرد و انقباض قلب هستند (۴). ROS یک اصطلاح کلی برای گونه‌های مشتق شده از O_2 است که فعال‌تر از خود O_2 هستند (۴ و ۵). تمام رادیکال‌های اکسیژن، ROS هستند ولی همه ROSها رادیکال‌های اکسیژن نیستند (۵). باید اذعان کرد که نمی‌توان از تشکیل ROS درون‌زاد و برون‌زاد اجتناب کرد. ROS زمان استخراج انرژی از ترکیب مواد غذایی و اکسیژن و یا قرارگیری در معرض عفونت‌های میکروبی، فعالیت بدنی شدید، آلاینده‌ها و سموم مثل دود سیگار، الکل، اشعه UV، آفت‌کش‌ها و ازن تولید می‌شود (۷-۵). 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 می‌گردد (۷). 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 (۸). قرارگیری در معرض سطوح پائین H_2O_2 حفاظت در برابر مواجهه بعدی با سطوح بالاتر H_2O_2 را افزایش می‌دهد (۹). چندین مطالعه نشان دادند که القای سطوح پائین H_2O_2 باعث افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو (۱۱-۹) در رت‌ها شده است. از سوی دیگر، استرس اکسیداتیو شدید می‌تواند باعث مرگ سلولی شده و به سمت شرایط بیماری‌زایی سوق پیدا کند (۱۰، ۱۲ و ۱۳). درجه استرس اکسیداتیو تجربه شده توسط سلول، تابعی از فعالیت واکنش‌های تولیدکننده ROS و فعالیت سیستم مهار ROS خواهد بود (۷).

از سوی دیگر، التهاب میوکارد، نقش محوری در عملکرد قلب و اختلالات آن بازی می‌کند (۱۴) و یکی از مشخصه‌های متداول در CVDs است (۱۵). التهاب، القاننده قوی استرس اکسیداتیو است و NF- κ B به التهاب، پاسخ داده و استرس اکسیداتیو را القا می‌کند (۱۶). استرس اکسیداتیو و التهاب در مسیرهای سیگنالی متداول و مشترکی سهیم هستند. ROS از طریق آسیب‌زدن به ماکرومولکول‌ها می‌تواند التهاب را آغاز کند؛ همچنین ROSها فرآورده‌ای از فرآیند التهاب

هستند (۱۷). چندین عامل رونویسی، نقش مهمی در توسعه التهاب میوکارد و CVDs دارند (۱۸). عامل هسته‌ای کاپا B (NF κ B)، یک عامل رونویسی پلی‌تروپیک است که با آسیب‌شناسی بسیاری از بیماری‌های قلبی ارتباط دارد. استرس اکسیداتیو باعث انتقال NF κ B به هسته و ایجاد رونویسی از چند ژن آسیب‌زا (۱۹) و واسطه‌گر بیان تعدادی ژن از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌شود (۱۴ و ۱۸). در پستانداران، سوپر خانواده عامل‌های رونویسی NF- κ B شامل حداقل پنج ژن است. NF- κ Bp65 یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده NF- κ B است و نقش مهمی در توسعه بیماری دارد (۱۸ و ۱۹). کاهش استرس اکسیداتیو قلب با کاهش اتصال NF κ B-p65 به DNA و کاهش هیپرتروفی قلبی همراه است (۱۹). NF- κ Bp65 نقش مهمی در تنظیم فعال‌سازی و عملکرد NF- κ B دارد. پس از انتقال NF- κ B به هسته، NF- κ Bp65 تحت تغییرات پس ترجمه‌ای خاصی قرار می‌گیرد تا عملکرد NF- κ B را به‌عنوان عامل رونویسی افزایش دهد (۲۰).

تعدیل پاسخ التهابی یک روش جدید و امیدوارکننده در درمان CVDs است (۱). اخیراً دریافته‌اند که ویتامین D (VD) نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی/التهابی بازی می‌کند (۲۱). VD ویتامینی محلول در چربی و به مثابه یک هرمون استروئیدی است (۲۴-۲۲). فقدان VD در جمعیت انسانی همه‌گیر است (۲۱)، شواهدی مبنی بر افزایش حوادث قلبی عروقی در زمستان و با افزایش فاصله از خط استوا وجود دارد (۲۴-۲۲). اطلاعات اپیدمیولوژیک نشان دادند که کمبود VD با CVD همراه است (۲۱، ۲۴ و ۲۵). اکثر سلول‌های قلبی عروقی و التهابی، ژن پیش‌ساز $1,25(OH)_2D$ را بیان می‌کنند که نشان‌دهنده اهمیت VD در این سلول‌ها است (۲۴ و ۲۵). همانگونه که ذکر شد (VD) نقش مهمی در مدولاسیون سیستم ایمنی/التهابی بازی می‌کند و این نقش را از طریق تنظیم تولید سایتوکاین‌های التهابی و مهار تکثیر سلول‌های پیش‌التهابی انجام می‌دهد که هر دو اینها در پاتوژنز بیماری‌های التهابی نقش تعیین‌کننده دارند (۲۱، ۲۴ و ۲۵). VD3 همچنین فعالیت NF- κ B را مهار می‌کند و این کار را با سرکوب انتقال هسته‌ای NF- κ B و فعالیت رونویسی آن انجام می‌دهد (۲۵). مهار فعال‌سازی NF- κ B یک راهبرد مؤثر برای جلوگیری از تولید سیتوکین التهابی و پیش‌التهابی است. سرکوب فعال‌سازی NF- κ B در کاهش التهاب قلب دخالت دارد (۱۴ و ۱۵).

از سوی دیگر فواید قلبی عروقی فعالیت تمرینی به‌طور مکرر به کاهش بسیاری از عوامل خطر قلبی عروقی از جمله استرس و التهاب نسبت داده می‌شود (۱۷). فعالیت تمرینی، انواع عوامل استرس‌زای مکانیکی، متابولیکی و اکسیداتیو را بر روی سیستم قلبی عروقی و عضلات اسکلتی وارد می‌کند. (۲۶). تولید ROS به‌طور موقت در طول ورزش افزایش می‌یابد؛ با این حال، بروز بیماری‌های مرتبط با استرس

دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد.

رت‌ها به مدت یک هفته قبل از شروع پروتکل با محیط و نوارگردان سازگار شدند. سپس به‌طور تصادفی به ۱۰ گروه (n=۶) شامل: گروه شاهد، آب اکسیژنه، آب اکسیژنه دوبرابر؛ آب اکسیژنه+ویتامین دی؛ آب اکسیژنه دوبرابر+ویتامین دی؛ آب اکسیژنه+تمرین؛ آب اکسیژنه دوبرابر+تمرین؛ آب اکسیژنه+ویتامین دی+تمرین؛ آب اکسیژنه دوبرابر+ویتامین دی+تمرین و نهایتاً دی‌متیل سولفوکساید+سالیین تقسیم شدند. طول مدت پروتکل مداخله‌گر ۸ هفته بود. تزریق درون صفاقی H₂O₂ در گروه‌های آب اکسیژنه با دوز ۱ میلی‌مول به ازای هر کیلوگرم از وزن بدنشان (۹ و ۱۰) و در گروه‌های آب اکسیژنه دو برابر، با دوز ۲ میلی‌مول به ازای هر کیلوگرم از وزن بدنشان (۱۰، ۱۲ و ۱۳) به‌صورت ۳ بار در هفته در روزهای زوج (۹) و تزریق درون صفاقی ویتامین D₃، ۰/۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن به‌صورت روزانه (۲۲) انجام شد. جهت رسیدن به دوز مناسب تزریقی از نورمال سالیین برای رقیق کردن و از دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) جهت حل کردن ویتامین D₃ در سالیین استفاده شد. باتوجه به لزوم بررسی تأثیر حلال مذکور یک گروه به‌نام DMSO تعریف شد که روزانه فقط حلال دریافت کردند.

در پژوهش حاضر، از فعالیت تمرینی منظم به‌طور روزانه بر روی نوارگردان مخصوص جوندگان به مدت ۸ هفته استفاده شد، شب نوارگردان ۱۰ درجه ثابت بود ولی سرعت و مدت تمرین به تدریج افزایش یافت و از ۸ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفته اول، ۱۲ متر در دقیقه با زمان مشابه در هفته دوم، ۱۶ متر در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه در هفته سوم، ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه در هفته چهارم افزایش یافت. طی هفته‌های پنجم تا هشتم سرعت در ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه ثابت ماند (۲۸).

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه پروتکل، جهت اجتناب از سهم زیاد تولید ROS درون‌زا (۲۹) و بعد از ۱۲ ساعت گرسنگی، رت‌ها با استنشاق کلروفورم بی‌هوش و سپس با بریدن سر قربانی شدند. قلب‌ها به دقت جدا و بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور و منجمد شدند و برای آزمایشات بعدی در دمای -75°C نگهداری گردیدند. بافت قلب رت‌ها به‌وسیله اضافه کردن بافر حاوی NaCl، 50mM Tris-HCl، و 12μM leupeptin با استفاده از هموژنایزر برقی تنظیم و بر روی ۸۰۰ دور در دقیقه هموژنایز شد. نمونه‌های هموژنایز شده سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از مایع رویی برای سنجش NF-κB-p65 استفاده شد. میزان غلظت با استفاده از کیت الایزای ساخت شرکت Bioassay Technology Laboratory با کد E0290Ra و میزان

اکسیداتیو با تمرین منظم کاهش می‌یابد. ورزش منظم نیز آسیب اکسیداتیو را تضعیف می‌کند (۲۷). انجام تمرین منظم و تجویز مقادیر کم از H₂O₂، هر دو باعث افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود (۹). تأثیر تحریکی فعالیت تمرینی بر روی تولید ROS، یک پدیده مهم از سازگاری ناشی از تمرین است که به‌وسیله آن مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو دراز مدت افزایش می‌یابد و یک راهکار فیزیولوژیکی ارزشمند جهت پیش‌آماده‌سازی میوکارد است (۹، ۱۷ و ۲۶). وهله‌های شدید فعالیت تمرینی منجر به آسیب گذرا به اجزاء انقباضی عضلات اسکلتی و تحریک پاسخ التهابی می‌شود که سطوح سایتوکاین‌های پیش التهابی در خون را افزایش می‌دهد. فعالیت تمرینی همچنین مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی و بازسازی پروتئین‌ها در بدن را از طریق عوامل رونویسی حساس به رودوکس از جمله NF-κB تنظیم مثبت می‌کند. افزایش گذرا و موقتی در سطوح ROS آبخار NF-κB را فعال می‌کند. آبخار سیگنالی NF-κB، همگرا با تنظیم مثبت مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای مقابله و جلوگیری از تشکیل سیکل‌های معیوب التهابی و استرس اکسیداتیو است که در ارتباط با بیماری‌های قلبی عروقی اتفاق می‌افتد (۱۷).

بنابراین، از آنجا که بیماری‌های قلبی عروقی و استرس اکسیداتیو مشکل بزرگی است که مردم دنیا با آن مواجهند و فعالیت بدنی منظم با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر به کاهش فشار اکسیداتیو می‌گردد و با نظر به اثبات تأثیر مطلوب فعالیت تمرینی و VD به تنهایی، بر روی تشکیل سیکل‌های معیوب التهابی، استفاده از مکمل آنتی‌اکسیدانی VD احتمال دارد بتواند اثر فعالیت تمرینی منظم را تقویت کند؛ با عنایت به کمبود و شاید حتی نبود مطالعه‌ای که اثر همزمان فعالیت تمرینی منظم و VD را بر آسیب اکسیداتیو و عوامل التهابی میوکارد بررسی کرده باشد، در این پژوهش به دنبال پاسخ به این سؤال هستیم که در طولانی مدت توانایی H₂O₂ برای تأثیر بر روی التهاب عضله قلبی چگونه است و آیا ممکن است تلفیق فعالیت تمرینی منظم و مصرف VD بر سیکل معیوب التهابی بافت میوکارد رت‌های قرار گرفته در معرض H₂O₂ تعدیل شود.

مواد و روش‌ها

۶۰ سر رت نر بالغ از نژاد ویستار با وزن 20±20 گرم و ۱۰-۸ هفته‌ای از مرکز حیوانات دانشگاه شیراز تهیه و به اتاق حیوانات مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انتقال یافت. به‌طور تصادفی هر ۵ رت در قفس پلی پروپیلن، با اندازه ۱۶*۳۰*۴۲ سانتی‌متر، تحت شرایط استاندارد و کنترل دمایی 22±2 درجه سانتی‌گراد، چرخه متناوب روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و آزادانه به آب و غذای ویژه رت (شرکت غذای دام پارس، تهران، ایران) دسترسی داشتند. همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات باتوجه به

p65 دارد. از آنجایی که عامل تمرین در دو سطح انجام تمرین و عدم تمرین در نظر گرفته شد، نتایج آزمون‌های دو به دو در جدول ۲ ارایه شده است. نتایج آزمون بنفرونی نشان داد که غلظت پروتئین NF_κB-p65 در پایان دوره به‌طور معنی‌داری در گروه تمرین از گروه عدم تمرین ($P=0/049$) کمتر بود. آب اکسیژنه نیز اثر معنی‌داری داشت ($P=0/013$). از آنجایی که عامل آب اکسیژنه در دو سطح دوز بالا و دوز پایین در نظر گرفته شد، نتایج آزمون‌های دو به دو در جدول ۲ ارایه شده است. نتایج آزمون بنفرونی نشان داد که غلظت پروتئین NF_κB-p65 در پایان دوره به‌طور معنی‌داری در گروه دوز بالای آب اکسیژنه بیشتر از گروه دوز پایین آب اکسیژنه ($P=0/013$) بود. در حالی که ویتامین D اثر معنی‌داری بر NF_κB-p65 نداشت. از آنجایی که تعامل بین تمرین و ویتامین D معنی‌دار شده است، میزان و نوع تعامل، مورد محاسبه قرار گرفته و در جدول ۳ ارایه شده است.

حساسیت ۰/۰۲۶ نانوگرم در میلی‌لیتر، طبق دستورالعمل کارخانه مذکور اندازه‌گیری شد.

از نرم‌افزار SPSS جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. قبل از تجزیه و تحلیل آماری، فرض طبیعی توزیع داده‌ها توسط آزمون کلموگروف-اسمیرنوف و تجانس واریانس بین گروه‌ها، بوسیله آزمون تجانس واریانس لوین انجام گرفت. جهت آزمون فرضیه‌ها بعد از دوره تمرین، تحلیل سه طرفه واریانس برای گروه‌های مستقل انجام و در صورت وجود تفاوت معنی‌دار، برای مشخص شدن گروه‌های متفاوت از آزمون تعقیبی بنفرونی استفاده و سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تحلیل سه طرفه واریانس مستقل جهت تعیین اثر تمرین و ویتامین D بر غلظت پروتئین NF_κB-p65 در رت‌های قرار گرفته در معرض H_2O_2 در جدول ۱ ارایه شده است. براساس نتایج به‌دست آمده مشخص شد که تمرین اثر معنی‌داری بر غلظت پروتئین NF_κB-

جدول ۱- نتایج آزمون تحلیل سه طرفه واریانس مستقل بر غلظت پروتئین NF_κB-p65 (ng/ml) در گروه‌های پژوهش

عامل	مجموع مربعات	df	F	sig	اندازه اثر
تمرین	۰/۰۰۲	۱	۴/۱۲۸	۰/۰۴۹*	۰/۰۹۴
ویتامین D	۰/۰۰۲	۱	۳/۸۳۸	۰/۰۵۷	۰/۰۸۸
آب اکسیژنه	۰/۰۰۴	۱	۶/۷۷۰	۰/۰۱۳*	۰/۱۴۵
تمرین* ویتامین D	۰/۰۰۵	۱	۹/۶۰۵	۰/۰۰۴*	۰/۱۹۴
تمرین* آب اکسیژنه	۰/۰۰۰	۱	۰/۲۱۸	۰/۶۴۳	۰/۰۰۵
ویتامین D* آب اکسیژنه	۰/۰۰۰	۱	۰/۳۶۱	۰/۵۵۲	۰/۰۰۹
تمرین* ویتامین D* آب اکسیژنه	۰/۰۰۳	۱	۴/۵۸۳	۰/۰۳۸*	۰/۱۰۳

* سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ است.

جدول ۲- نتایج آزمون تعقیبی بنفرونی بر غلظت پروتئین NF_κB-p65 در گروه‌های پژوهش

گروه‌ها	میانگین تفاوت‌ها	خطای انحراف	سطح معنی‌داری
انجام تمرین	۰/۰۱۴	۰/۰۰۷	۰/۰۴۹*
دوز بالا	۰/۰۱۸	۰/۰۰۷	۰/۰۱۳*

* سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ است.

جدول ۳- تعامل تمرین و ویتامین D بر غلظت پروتئین NF_κB-p65

	ویتامین D (-)	ویتامین D (+)
تمرین (-)	A (۰/۱۰۴)	B (۰/۰۷۰)
تمرین (+)	C (۰/۰۶۹)	D (۰/۰۷۷)

در جدول فوق اگر میانگین گروه B از گروه A کم شود، اثر اصلی ویتامین D را نشان می‌دهد. اگر میانگین گروه C که گروه تمرین است از گروه A کم شود، اثر اصلی تمرین را نشان می‌دهد. حال اگر اثر اصلی تمرین با اثر ویتامین D جمع شود، آنگاه اثر مقادیر به‌دست آمده

گروه‌های تعاملی از هر یک کم گردد می‌توان به محل اصلی تعامل بین تمرین و ویتامین D پی برد. در اینجا اثر تمرین به تنهایی با اثر ویتامین D، $0/069$ است. در حالی که مقادیر به‌دست آمده از تعامل این دو $0/027$ است که نتیجه‌گیری می‌شود تعامل، معنی‌دار و دارای اثر کاهنده می‌باشد. پس همزمانی تمرین با ویتامین D، اثر کاهنده بر غلظت پروتئین NF_κB-p65 دارد. تعامل تمرین و آب اکسیژنه، تعامل ویتامین D و آب اکسیژنه معنی‌دار نبود. اما تعامل تمرین، ویتامین D و آب اکسیژنه اثر معنی‌داری بر غلظت پروتئین NF_κB-p65 داشت. از آنجایی که تعامل بین تمرین، ویتامین D و آب اکسیژنه

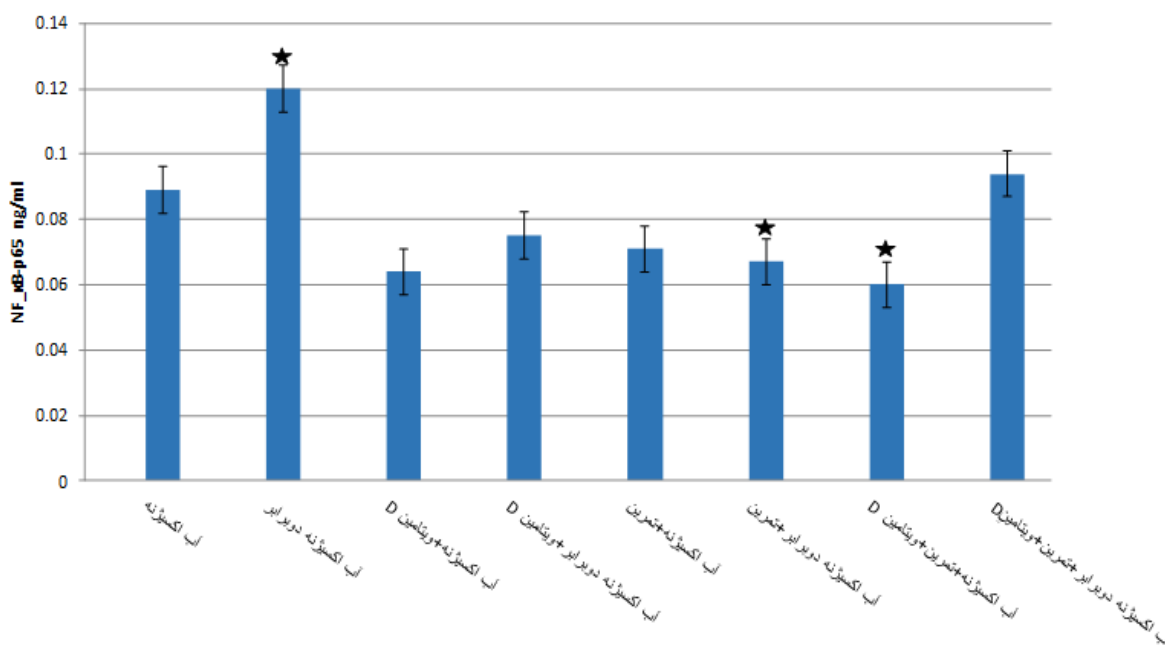
گروه‌های F و H نشانه تعامل است. حال اگر تک تک گروه‌ها با هم جمع شود و میزان آن با گروه‌های تعاملی بیشتر یا کمتر باشد نشانه تعامل است. در اینجا مشخص می‌گردد که همزمانی این سه مداخله نسبت به جمع اثر تک تک هر یک، اثر کاهنده بر غلظت پروتئین NF-κB-p65 را داشته است. پس همزمانی تمرین با ویتامین D اثر کاهنده بر غلظت پروتئین NF-κB-p65 دارد. نتایج در نمودار ۱ آمده است.

معنی‌دار شده است، میزان و نوع تعامل مورد محاسبه قرار گرفته و در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴- تعامل تمرین آب اکسیژنه و ویتامین D بر غلظت پروتئین NF-κB-p65

دوز بالای آب اکسیژنه		دوز پایین آب اکسیژنه	
تمرین (+)	تمرین (-)	تمرین (+)	تمرین (-)
D(+)/۰.۷۱	C(+)/۰.۸۹	B(+)/۰.۶۷	A(+)/۱.۲۰
H(+)/۰.۶۰	G(+)/۰.۶۴	F(+)/۰.۹۴	E(+)/۰.۷۵

غلظت NF-κB-p65



نمودار ۱- مقایسه مقادیر غلظت NF-κB-p65 در گروه‌های پژوهش (ng/ml)
* تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها (P < 0.05).

بحث

شاخص التهاب قلب و همچنین، سرکوب و پیشگیری عوارض احتمالی ناشی از آن است. از سوی دیگر، تلفیق تمرین، ویتامین D و آب اکسیژنه تأثیر هم‌افزایی و سینرژیک در مهار فعالیت شاخص NF-κB-p65 دارد و در حفاظت و پیشگیری از عوارض ناشی از التهاب میوکارد مؤثر است، ۸ هفته مصرف ویتامین D منجر به کاهش اندک و غیر معنی‌دار غلظت پروتئین NF-κB-p65 بافت میوکارد رت‌ها شد. به نظر می‌رسد، مصرف ویتامین D در شرایط القای استرس اکسیداتیو بر شاخص NF-κB-p65 تأثیرگذار بوده است که از دلایل احتمالی آن می‌تواند کافی بودن مقادیر ویتامین D در میوکارد رت‌ها نسبت به زمان تمرین و القای استرس اکسیداتیو باشد. تاکنون پژوهشی به بررسی اثر

در تحقیق حاضر اثر ۸ هفته القای استرس اکسیداتیو برونزاد، فعالیت تمرینی منظم و مصرف ویتامین D بر سطوح پروتئین NF-κB-p65 بافت قلب رت‌های نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس یافته‌های پژوهش، القای دوز بالای آب اکسیژنه با افزایش معنی‌دار غلظت پروتئین NF-κB-p65 همراه بود و ۸ هفته تمرین منجر به کاهش معنی‌دار غلظت پروتئین NF-κB-p65 بافت میوکارد این رت‌ها شد. همزمانی تمرین با ویتامین D و همچنین تعامل بین تمرین، ویتامین D و آب اکسیژنه دارای اثر کاهنده بر غلظت پروتئین NF-κB-p65 بود که بیانگر تأثیر حفاظتی تمرین منظم در کاهش

که فسفوریلاسیون را هدایت می‌کند و IκB را تضعیف می‌کند و NF-κB آزاد ترشح می‌شود (۱۴). سپس واحدهای آزاد NF-κB (بیشتر NF-κB-p65) به داخل هسته انتقال می‌یابد و تعدادی از ژن‌های التهابی را فعال می‌کنند. بنابراین، هدف قرار دادن انتقال هسته‌ای NF-κB و زیر واحدهای آن می‌تواند یک هدف درمان بالقوه باشد (۱۴) و (۳۰). روی و همکاران پیشنهاد کردند که مصرف ویتامین D تأثیر محافظتی بر قلب دارد که احتمالاً از طریق افزایش بیان IκB منجر به تضعیف پروتئین‌های القایی و مهار NF-κB-p65 مشخص می‌شود و نتیجه گرفتند تجویز ویتامین D ممکن است نقش مهمی در جلوگیری یا کاهش میزان هیپرتروفی قلبی و بار بیماری‌های قلبی عروقی داشته باشد (۳۰). چویی و همکاران نشان دادند که مکمل ویتامین D₃ می‌تواند نقش مهمی در بهبود سریع و یا حفاظت از آسیب عضلانی و التهاب ناشی از ورزش به‌وسیله تعدیل آشار MAPK و NF-κB درگیر در VDR داشته باشد و این کار را با مهار انتقال هسته‌ای NF-κB-p65 و مهار فسفوریلاسیون IKK و IκB انجام می‌دهد (۳۱).

تأثیر تحریکی فعالیت تمرینی بر روی تولید ROS، یک پدیده مهم از سازگاری ناشی از تمرین است که به‌وسیله آن مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو دراز مدت افزایش می‌یابد و یک راهکار فیزیولوژیکی ارزشمند جهت پیش‌آماده‌سازی میوکارد است (۹، ۱۷، ۲۶). سالام و همکاران نشان دادند که فعالیت تمرینی منظم، سطوح نشانگران سیستماتیک التهاب را در جوانان و بزرگسالان میانسال و از آن مهمتر در سالمندان کاهش می‌دهد. فعالیت تمرینی همراه با افزایش گدرا و موقتی سطوح ROS، آشار NF-κB را فعال می‌کند. آشار NF-κB همگرا با تنظیم مثبت مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی، برای مقابله و جلوگیری از تشکیل سیکل‌های معیوب التهاب و استرس اکسیداتیو عمل می‌کند که در ارتباط با بیماری‌های قلبی عروقی هستند (۱۷).

با مقایسه تحقیقات فوق با یافته‌های تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که در شرایط استرس اکسیداتیو، تنظیم NF-κB-p65 میوکارد با فعالیت تمرینی منظم و مداوم و مصرف ویتامین D متفاوت از تنظیم آن بدون این مداخلات باشد. براساس شواهد، مهار بیان و فعالیت NF-κB-p65 در بافت قلب منجر به کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌گردد که این اثر با کاهش التهاب میوکارد همراه است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استرس اکسیداتیو زیاد با افزایش سطوح پروتئین NF-κB-p65 می‌تواند باعث التهاب میوکارد شود. علاوه بر این، فعالیت تمرینی منظم بر روی تردمیل، تعامل تمرین و مصرف ویتامین D و همچنین همزمانی استرس اکسیداتیو، تمرین و مصرف ویتامین D ممکن است اثر حفاظت خود از میوکارد را در مقابل التهاب میوکاردی از طریق تنظیم منفی فعالیت NF-κB-p65

تمرین، ویتامین D و این روش القای استرس اکسیداتیو بر پروتئین NF-κB-p65 نپرداخته است، از این‌رو پژوهش حاضر اولین مطالعه انجام گرفته در این زمینه به‌شمار می‌رود. هر چند مطالعات مختلفی به بررسی NF-κB-p65 و آشار آن در شرایط فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی پرداخته‌اند. در مطالعه باگول و همکاران (۲۰۱۵) کاهش معنی‌دار در غلظت پروتئین NF-κB-p65 بافت میوکارد طی شرایط القای استرس اکسیداتیو با تغذیه فروکتوز (۱۹) مشاهده گردید. با وجود درک چندین مسیر آشار که باعث توسعه و پاتوژنز CVDs می‌شوند، استرس اکسیداتیو همچنان یکی از مهمترین مشارکت‌کنندگان است. افزایش استرس اکسیداتیو منجر به فعال شدن آشارهای مختلف سیگنالی می‌شود و فعالیت پروتئین‌ها را با تغییرات پس از ترجمه یا تعدیل سنتز پروتئین تغییر می‌دهد (۱۹). مطالعاتی که با القای برون‌زاد H₂O₂، استرس اکسیداتیو را در بافت‌ها ایجاد کردند، عموماً کوتاه مدت و یا به‌صورت *in vitro* صورت گرفته‌اند. از این‌رو پژوهش حاضر اولین مطالعه انجام گرفته در زمینه القای برون‌زاد H₂O₂ با دوز بالای آب اکسیژنه در دوره زمانی طولانی ۸ هفته به‌شمار می‌رود. راداک و همکاران با القای دوز پایین آب اکسیژنه و ۸ هفته تمرین هوازی شنا، کاهش گروه‌های کربونیل زیر سطح پایه، تحریک عملکرد پروتئازوم و DT-دیافوراز را در عضله قلبی مشاهده کردند (۹). همچنین، لی و همکاران افزایش فسفوریلاسیون پروتئین تیروزین اسپرم (۱۰) و پوری و همکاران افزایش حساسیت ترومبوکسان عروقی و مستعد شدن این بخش‌های شریانی جهت تنگ‌شدگی پروستاگلندین‌ها (۱۱) در رت‌ها به‌دنبال القای سطوح پایین H₂O₂ مشاهده کردند که همگی بیانگر افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو است. از سوی دیگر، لی و همکاران مهار فسفوریلاسیون پروتئین تیروزین اسپرم (۱۰)، مالتیک و همکاران افزایش متابولیسم انرژی در رتیکولوسیت‌ها (۱۲)، ماکینو و همکاران افزایش میانگین فشار خون شریانی و پرفشاری خون (۱۳) را با القای سطوح بالای H₂O₂ در رت‌ها نشان دادند و جهت‌گیری استرس اکسیداتیو زیاد را به سمت شرایط پاتولوژیک و بیماری‌ها، نتیجه گرفتند.

عامل رونویسی NF-κB تنظیم‌کننده اصلی واکنش التهابی است. NF-κB رونویسی ژن‌هایی را کنترل می‌کند که التهاب، رشد سلول‌های ایمنی، چرخه سلولی، تکثیر و مرگ سلولی را کنترل می‌کنند. نقش اساسی NF-κB در فرآیندهای کلیدی فیزیولوژیکی، آن را عامل مهمی در تعیین سلامت و بیماری مشخص می‌کند. NF-κB با طیف وسیعی از محرک‌ها و گیرنده‌های ایمنی فعال می‌شود. کمپلکس NF-κB با پروتئین‌های مهارکننده IκB در سیتوپلاسم محدود می‌شود و انتقال آن را به هسته محدود می‌کند. با این حال، سیگنال‌های فعال‌سازی از آشار بالادست در IKK همگرا می‌شوند،

16. Cardinale JP, Sriramula S, Mariappan N, Agarwal D, Francis J. Angiotensin II-induced hypertension is modulated by nuclear factor-κB in the paraventricular nucleus. *Hypertension* 2012;59:113-21. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.182154
17. Sallam N, Laher I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:7239639. doi: 10.1155/2016/7239639
18. Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Chapter one - nuclear factor-κB activation as a pathological mechanism of lipid metabolism and atherosclerosis. *Advances in Clinical Chemistry* 2015;70:1-30. doi: 10.1016/bs.acc.2015.03.004
19. Bagul PK, Deepthi N, Sultana R, Banerjee SK. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NFκB-p65 and histone 3. *J Nutr Biochem* 2015;26:1298-307. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.06.006
20. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The regulation of NF-κB subunits by phosphorylation. *Cells* 2016;5:12. doi: 10.3390/cells5010012
21. Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res* 2014;7:69-87. doi:10.2147%2FJIR.S63898
22. 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
23. Halder SK, Sharan C, Al-Hendy O, Al-Hendy A. Paricalcitol, a vitamin D receptor activator, inhibits tumor formation in a murine model of uterine fibroids. *Reprod Sci* 2014;21:1108-19. doi: 10.1177/1933719114537721
24. Norman P, Powell J. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res* 2014;114:379-93. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301241
25. Chen S, Swier VJ, Boosani CS, Radwan MM, Agrawal DK. Vitamin D deficiency accelerates coronary artery disease progression in swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:1651-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307586
26. Lawler JM, Rodriguez DA, Hord JM. Mitochondria in the middle: Exercise preconditioning protection of striated muscle. *J Physiol* 2016;594:5161-83. doi: 10.1113/JP270656
27. Sallam N, Laher I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:7239639. doi: 10.1155/2016/7239639
28. 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
29. 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.
30. Roy A, Srivastava M, Saqib U, Liu D, Faisal SM, Sugathan S, et al. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. *International immunopharmacology*. 2016;40:79-89. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.026>
31. Choi M, Park H, Cho S, Lee M. Vitamin D3 supplementation modulates inflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. *Cytokine* 2013;63:27-35. doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.018

کاهش غلظت پروتئین NF_κB-p65 در بافت قلب میانجی‌گری نماید.

این مقاله دارای کد کمیته اخلاق IR.KMU.REC.1396.1562 از وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان کرمان معاونت تحقیقات و فناوری می‌باشد.

References

1. Steven S, Münzel T, Daiber A. Exploiting the pleiotropic antioxidant effects of established drugs in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 2015;16:18185-223. doi:10.3390/ijms160818185
2. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 2015;97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040
3. 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
4. Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2017. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.013
5. Halliwell B, Gutteridge JM, editors. *Free radicals in biology and medicine*. USA: Oxford University Press;2015.
6. 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
7. 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
8. 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
9. Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucsek 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
10. 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%2Faja.2009.78
11. Puri N, Zhang F, Monu SR, Sodhi K, Bellner L, Lamon BD, et al. Antioxidants condition pleiotropic vascular responses to exogenous H2O2: role of modulation of vascular TP receptors and the heme oxygenase system. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:471-80. doi: 10.1089/ars.2012.4587
12. Maletic S, Dragicevic-Djokovic LM, Ognjanovic B, Zikic R, Stajn A, Kostic M. Alterations of rat reticulocyte (anti) oxidant status and energy metabolism influenced by hydrogen-peroxide. *Acta Biologica Iugoslavica Serija C* 1999;35.
13. 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
14. Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, et al. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis* 2016;7:e2234. doi: 10.1038%2Fcds.2016.140
15. Dange RB, Agarwal D, Masson GS, Vila J, Wilson B, Nair A, et al. Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res* 2014;103:17-27. doi: 10.1093/cvr/cvu067



The Simultaneous Effect of Regular Exercise and Vitamin D on NF- κ Bp65 levels in Male Rats Exposed to Hydrogen Peroxide

Naemeh MohseniZadeh (Ph.D. Student)¹, Mohammad Ali Azarbayjani (Ph.D.)^{*1}, Hamid Najafipour (Ph.D.)², Hasan Matin Homaei (Ph.D.)¹, AbbasAli Keshtkar (Ph.D.)³

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

2- Physiology Research Center & Dept. of Physiology, School of Medical, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

3- Dept. of Epidemiology, School of Medical, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 6 October 2017, Accepted: 28 October 2017

Abstract:

Introduction: Oxidative stress and inflammation are involved in common signaling pathways and play central role in heart functions and disorders. Factor kappa-B p65 (NF- κ Bp65), is an important marker of myocardial inflammation. This study investigated the combination of regular exercise (E), vitamin D (VD) and oxidative stress induced on the levels of NF- κ Bp65 in the myocardium.

Methods: 60 adult male rats of the Wistar race were randomly divided into 10 groups: control; H₂O₂; 2H₂O₂; H₂O₂+VD₃; 2H₂O₂+VD₃; H₂O₂+E; 2H₂O₂+E; H₂O₂+VD₃+E; 2H₂O₂+VD₃+E and dimethyl sulfoxide + saline that were under the intervention protocol for 8 weeks. An ELISA kit used to measure NF- κ Bp65 concentration. Data were analyzed three-way ANOVA. Significant level was set at 0.05.

Results: The results showed the Exercise had a decrease effect on NF- κ Bp65 protein concentration (P=0.049). Also, high concentration of H₂O₂ increased the NF- κ Bp65 protein concentration (P=0.013). On the other hand, the interaction of E and VD had decreasing effect on NF- κ Bp65 protein concentration (P=0.004). However, VD and E interaction with H₂O₂ were not significant. Coincidence of three interventions E, H₂O₂ and VD compared to the combined effect of each one, had a decreasing effect on the protein concentration of NF- κ Bp65 (P=0.038).

Conclusion: It seems that regular exercise activity, VD antioxidant and exogenous induction of oxidative stress can be used to preconditioning and reduce myocardial inflammation in high oxidative stress conditions.

Keywords: Myocardial inflammation, Oxidative stress, NF- κ B p65, Regular exercise activity, Vitamin D.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: MA. Azarbayjani, Email: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

Citation: MohseniZadeh N, Azarbayjani MA, Najafipour H, Matin Homaei H, Keshtkar AA. The simultaneous effect of regular exercise and vitamin d on nf-kbp65 levels in male rats exposed to hydrogen peroxide. Journal of Knowledge & Health 2017;12(3):55-62.