

## اثر هشت هفته تمرین هوازی و مکمل یاری ویتامین D بر استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز سرم موش‌های صحرائی مسموم شده با $H_2O_2$

مارینا شریعتی<sup>۱</sup>، محمدعلی آذربایجانی<sup>۲</sup>، غلامرضا کاکا<sup>۳</sup>، شیرین زیلائی بوری<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

۲- نویسنده مسئول: استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. پست الکترونیک: m\_azarbayjani@iauctb.ac.ir

۳- دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

۴- استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد مسجدسلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجدسلیمان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۴

### چکیده

**سابقه و هدف:** پوکی استخوان یکی از انواع بیماری‌های استخوان است که عوامل متعددی چون استرس اکسیداتیو در ایجاد آن نقش دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر همزمان فعالیت بدنی هوازی و مکمل یاری ویتامین D بر استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز سرم موش‌های صحرائی مسموم شده با  $H_2O_2$  بود.

**مواد و روش‌ها:** ۶۰ سر نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۱۰ گروه شش سری شامل، (۱) دریافت آب اکسیژنه ( $H_2O_2$ )؛ (۲) دریافت آب اکسیژنه دو برابر؛ (۳) آب اکسیژنه + ویتامین D؛ (۴) آب اکسیژنه + تمرین هوازی؛ (۵) آب اکسیژنه + ویتامین D + تمرین هوازی؛ (۶) آب اکسیژنه دو برابر + ویتامین D؛ (۷) آب اکسیژنه دو برابر + تمرین هوازی؛ (۸) آب اکسیژنه دو برابر + ویتامین D + تمرین هوازی؛ (۹) شم دی-متیل سولفوکسید + نرمال سالین) و (۱۰) کنترل تقسیم و به مدت ۸ هفته تحت پروتکل مداخله قرار گرفتند. سطوح سرمی استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز به روش الایزا اندازه‌گیری شدند. جهت بررسی تفاوت گروه‌های آب اکسیژنه، آب اکسیژنه دو برابر، شم و کنترل از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و جهت بررسی اثرات تعاملی تمرین هوازی و ویتامین D بر متغیرهای تحقیق از آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد ( $p \leq 0.05$ ).

**یافته‌ها:** هشت هفته تمرین هوازی و ویتامین D اثر تعاملی بر کاهش معنی‌دار سطوح سرمی استئوکلسین موش‌های صحرائی مسموم شده با دوز ۱ میلی‌مول بر کیلوگرم از وزن بدن موش‌های صحرائی داشت ( $p=0.001$ )؛ تمرین هوازی ( $p=0.006$ ) موجب افزایش معنی‌داری سطوح سرمی استئوکلسین در مقایسه با گروه‌های بدون تمرین هوازی در موش‌های صحرائی مسموم شده با دوز ۲ میلی‌مول بر کیلوگرم از وزن بدن شد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین و مکمل یاری ویتامین D موجب بهبود نشانگران تشکیل استخوان می‌گردد. با این وجود با توجه به معنی‌دار نبودن تأثیر آب اکسیژنه بر متغیرهای تحقیق انجام پژوهش‌های بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** تمرین هوازی، ویتامین D، استئوکلسین، آلکالین فسفاتاز، هیدروژن پراکساید

### • مقدمه

می‌شوند (۲). همبستگی معنی‌داری بین افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش تراکم استخوان به اثبات رسیده است (۳). استرس اکسیداتیو نمایان‌گر عدم توازن میان رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن بوده و می‌تواند در روند افزایش سن، باعث اختلال در مکانسیم‌های طبیعی سیگنال‌های سلولی، ایجاد وضعیت التهابی و اختلال

پوکی استخوان یکی از انواع بیماری‌های استخوان است که عوامل متعددی چون بر هم خوردن تعادل میزان کلسیم روی ماتریکس استخوان، کاهش مقدار استخوان در واحد حجم، ضایعات متابولیک استخوان و افزایش سن در پیشرفت آن مؤثر است (۱). مطالعات نشان می‌دهند، یک سوم زنان و یک پنجم مردان بعد از سن ۵۰ سالگی به این بیماری مبتلا

(۱۲). مطالعاتی در مورد تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر نشانگر-های بیوشیمیایی استخوان انجام شده است به عنوان مثال تمرین هوازی موجب افزایش کلسیم، استروژن و پاراتورمون گردید ولی اثر معنی‌داری بر آلکالین فسفاتاز زنان مبتلا به یائسگی زودرس نداشت (۱۲)؛ همچنین تمرین هوازی، اثر معنی‌داری بر سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین مردان مبتلا به دیابت نوع ۲ (۱۰) و سطوح پاراتورمون و هموگلوبین گلیکولیزه در زنان یائسه دیابتی (۱۱) نداشت. با این وجود تمرین هوازی موجب افزایش معنی‌دار استئوکلسین و افزایش غیرمعنی‌دار آلکالین فسفاتاز مردان مبتلا به بیماری ریوی گردید (۱۴).

با توجه به نتایج متناقض این مطالعات در مورد تمرینات ورزشی نقش تغذیه مناسب نیز در باب کاهش عوارض بیماری‌های مرتبط با افزایش سن بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد. از سوی ویتامین D به عنوان تنظیم‌کننده‌ی مرکزی هموستاز کلسیم و متابولیسم استخوان مطرح است (۱۵) مطالعات نشان می‌دهند که ویتامین D دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و کمبود این ویتامین موجب کاهش گلوکوتائین s و افزایش استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف بدن می‌گردد (۱۶)، همچنین دریافت کافی ویتامین D منجر به افزایش جذب فسفر و کلسیم از روده‌ها و کاهش دفع آن‌ها از کلیه‌ها شده و فرآیند استخوان‌سازی را افزایش می‌دهد. کمبود ویتامین D علت شناخته شده‌ی پوکی استخوان و ضعف ماهیچه‌ای، افزایش خطر شکستگی به دلیل سقوط از ارتفاع به خصوص در افراد سالمند است. علی‌رغم اینکه ویتامین D به واسطه اشعه ماورا بنفش در لایه اپیدرمال پوست و همچنین منابع غذایی تامین می‌شود ولی در بیشتر موارد این میزان کافی نیست (۱۵). از این رو مکمل دهی ویتامین D در پیشگیری و درمان پوکی استخوان مورد توجه محققین قرار گرفته است به گونه‌ای که شش هفته دریافت ویتامین D به مقدار ۶۰۰ IU/kg استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز موش‌های صحرایی اورکتومی شده را افزایش داد (۱۸، ۱۷).

مطالعات بی‌شماری ارتباط قوی بین فعالیت بدنی و کاهش خطر گسترش بیماری‌های مزمن از جمله پوکی استخوان را نشان داده‌اند، ولی عده‌ای از محققین بر این باورند که افزایش تولید ROS متعاقب فعالیت‌های ورزشی، ممکن است روند پیری را سرعت بخشد و افزایش سن نیز خود تولید گونه‌های اکسیژن فعال را افزایش می‌دهد (۱۹)، سلول‌های استخوان نیز از این روند افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در امان نیستند. بنابراین، با توجه به نتایج ضد و نقیض در خصوص فعالیت‌های

در هموستاز استخوان شود (۴-۶). افزایش ROS در سطح سلولی، موجب مرگ برنامه‌ریزی شده (apoptosis) در استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها می‌شود (۷). پراکساید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) یکی از انواع اکسیدان‌هاست که امروزه افراد جامعه در معرض آن قرار دارند. مطالعات نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض  $H_2O_2$  موجب آسیب‌های زیادی به ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها، قندها و DNA می‌گردد (۸). محققین بیان کردند که تزریق صفاقی  $H_2O_2$  اثر معنی‌داری بر افزایش تعداد سلول‌های میکرونوکلیوس‌دار مغز استخوان موش‌های صحرایی می‌گردد (۹). از آنجا که استخوان یک بافت متابولیکی فعال است که با دو فرآیند تشکیل و بازجذب استخوان پیوسته بازسازی می‌شود، هرگاه میزان بازجذب بیشتر از تشکیل باشد پوکی استخوان اتفاق می‌افتد، محققین معتقدند، افزایش آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو موجب عدم توازن در تشکیل و بازجذب بافت استخوانی می‌گردد (۱۰، ۳). نشانگرهای بیوشیمیایی مهم متابولیسم استخوان، استئوکلسین، پاراتورمون و آلکالین-فسفاتاز می‌باشند که نقش مهمی در ارزیابی و کنترل پوکی استخوان دارند. استئوکلسین پروتئین کلاژنی ماتریکس استخوانی و وابسته به ویتامین K می‌باشد و در بافت استخوان توسط سلول‌های استئوبلاست تولید می‌گردد و به نظر می‌رسد که تحت تأثیر هورمون‌های تنظیم‌کننده‌ی کلسیم از قبیل کلسی‌تونین، هورمون پاراتیروئید و ویتامین D قرار دارد؛ همچنین آلکالین فسفاتاز ایزوآنزیمی مشتق از استخوان است که فعالیت سلول‌های استئوبلاست و تشکیل استخوان را نشان می‌دهد، این آنزیم به درون مایع خارج سلولی ریخته می‌شود و افزایش میزان سرمی آن با میزان استخوان‌سازی ارتباط مستقیم دارد (۱۱، ۱۰).

اگرچه پوکی استخوان یک بیماری مرتبط با سن است، ولی تغییرات در نحوه‌ی زندگی، تغذیه و ورزش مناسب به خصوص در دوران نوجوانی باعث کاهش خطر ابتلا به پوکی استخوان می‌شود (۱۲). محققین بر این باورند که ورزش منظم می‌تواند در تنظیم تعادل آنتی‌اکسیدان/اکسیدان نقش داشته باشد. به گونه‌ای که در مطالعات خود به این نکته اشاره نموده‌اند که انجام فعالیت‌های ورزشی منظم موجب کاهش استرس اکسیداتیو گردیده است (۱۳). همچنین فعالیت ورزشی با افزایش تراکم مواد معدنی استخوان (به خصوص کلسیم و فسفر) باعث حفظ و افزایش توده‌ی استخوانی می‌شود و این امر به واسطه ترشح هورمون استروژن و از طریق افزایش میزان هورمون‌های کلسی‌تونین و کاهش پاراتورمون تسهیل می‌شود

آب اکسیژنه دو برابر + ویتامین D؛ (۷) آب اکسیژنه دو برابر + تمرین هوازی؛ (۸) آب اکسیژنه دو برابر + ویتامین D + تمرین هوازی؛ (۹) شم (دی-متیل سولفوکسید + نرمال سالین) و (۱۰) کنترل تقسیم شدند. در ادامه گروه‌های ۱، ۳، ۴ و ۵ با دوز ۱mmol/kg (۲۰) و گروه‌های ۲، ۶، ۷ و ۸ با دوز ۲mmol/kg (۲۱) به صورت ۳ بار در هفته در روزهای زوج تحت تزریق درون صفاقی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> قرار گرفتند (۲۱). گروه‌های ۳، ۵، ۶ و ۸ روزانه ۰/۵ μgram/kg ویتامین D<sub>3</sub> را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند جهت رسیدن به دوز مناسب تزریقی از نرمال سالین برای رقیق کردن و از دی-متیل سولفوکساید (DMSO) جهت حل کردن ویتامین D<sub>3</sub> 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 (۲۲). گروه‌های ۴، ۵، ۷ و ۸ به مدت هشت هفته تمرین هوازی را بر روی نوار گردان مخصوص جوندگان را انجام دادند، شیب نوارگردان ۱۰ درجه ثابت بود ولی سرعت و مدت تمرین به تدریج افزایش یافت و از هشت 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 با مدت ۶۰ دقیقه ثابت ماند (۲۳) (جدول ۱).

ورزشی بر نشانگرهای بیوشیمیایی استخوان و همچنین نبود اطلاعات کافی در مورد تأثیر مصرف همزمان ویتامین D و فعالیت ورزشی بر نشانگرهای بیوشیمیایی متابولیسم استخوان در مسمومیت با H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر همزمان هشت هفته فعالیت‌بدنی هوازی و مکمل یاری ویتامین D بر استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز موش‌های صحرایی مسموم شده با H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> انجام شد.

## • مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۶۰ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۰±۲۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری و پس از انتقال به خانه حیوانات مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به مدت یک هفته جهت سازگاری در قفس مخصوص حیوانات تحت شرایط استاندارد، دمای ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعت و دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص جوندگان (خریداری شده از شرکت غذای دام پارس، تهران، ایران) نگهداری شدند. موش‌های صحرایی به مدت یک هفته پیش از گروه‌بندی بر روی نوارگردان برای آشنایی دویدند. سپس به طور تصادفی به ده گروه شش سری شامل: (۱) دریافت آب اکسیژنه (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)؛ (۲) دریافت آب اکسیژنه دو برابر؛ (۳) آب اکسیژنه + ویتامین D؛ (۴) آب اکسیژنه + تمرین هوازی؛ (۵) آب اکسیژنه + ویتامین D + تمرین هوازی؛ (۶)

جدول ۱. پروتکل تحقیق با تفکیک گروه‌ها

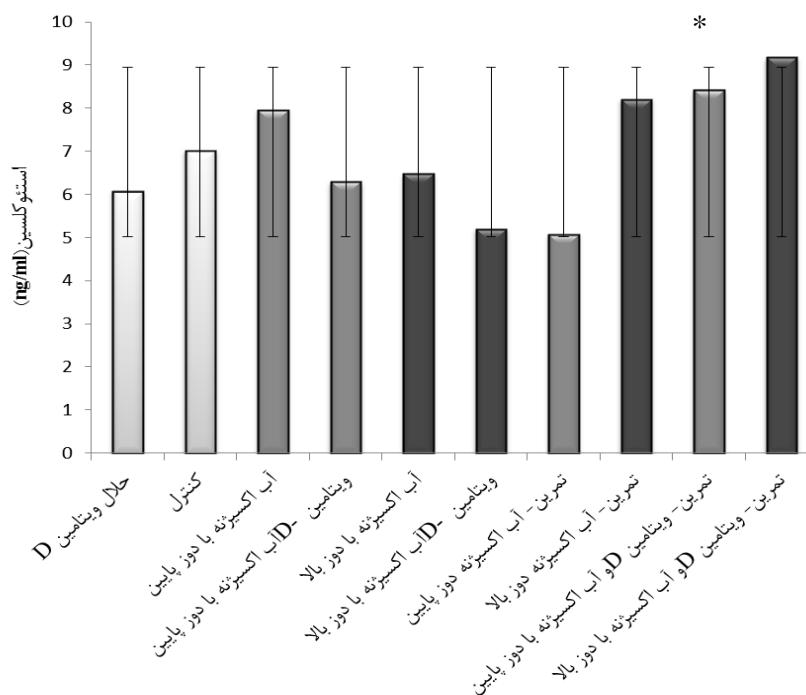
گروه	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم تا هشتم
ویتامین D μgram/kg/day	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آب اکسیژنه (۱mmol/kg)	تمرین (شیب ۱۰ درجه) ۸m/min ۳۰ Min	۱۲m/min ۳۰ Min	۱۶m/min ۴۵ Min	۲۰m/min ۴۵ Min	۲۰m/min ۶۰ Min
تمرین + ویتامین D	۸m/min ۳۰ Min +	۱۲m/min ۳۰ Min +	۱۶m/min ۴۵ Min +	۲۰m/min ۴۵ Min +	۲۰m/min ۳۰ Min +
آب اکسیژنه (۱mmol/kg)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
ویتامین D μgram/kg/day	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آب اکسیژنه (۲mmol/kg)	تمرین (شیب ۱۰ درجه) ۸m/min ۳۰ Min	۱۲m/min ۳۰ Min	۱۶m/min ۴۵ Min	۲۰m/min ۴۵ Min	۲۰m/min ۶۰ Min
تمرین + ویتامین D	۸m/min ۳۰ Min +	۱۲m/min ۳۰ Min +	۱۶m/min ۴۵ Min +	۲۰m/min ۴۵ Min +	۲۰m/min ۳۰ Min +
آب اکسیژنه (۲mmol/kg)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
کنترل	.....	.....	.....	.....	.....

شده از آنالیز واریانس دو طرفه (تحلیل عاملی  $2 \times 2$ ) و آزمون تعقیبی بونفرونی در نرم افزار SPSS استفاده شد ( $P < 0.05$ ).

### • یافته‌ها

در ابتدا میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای تحقیق در نمودار ۱ و ۲ ارائه شده است. جهت بررسی اثرات تزریق  $H_2O_2$  با دوزهای ۱ و ۲ mmol/kg بر متغیرهای تحقیق و بررسی تفاوت گروه‌های آب اکسیژنه، آب اکسیژنه دو برابر، شام و کنترل نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه در جدول ۲ نشان داد تفاوت معنی داری در سطوح سرمی استئوکلسین ( $p = 0.035$ )،  $F_{3, 16} = 1.15$  و آلکالین فسفاتاز ( $F_{3, 16} = 0.75$ ,  $p = 0.53$ ) در گروه‌های آب اکسیژنه، آب اکسیژنه دو برابر، شام و کنترل مشاهده نشد (جدول ۲).

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین موش‌های صحرایی با استنشاق کلروفورم بی‌هوش شدند و سپس خونگیری انجام شد. سطوح سرمی استئوکلسین با حساسیت ۰/۵۲ (ng/ml) و آلکالین فسفاتاز با حساسیت ۰/۰۲۱ (ng/ml) توسط کیت تجاری (BT) Bioassay technology ساخت کشور چین به روش الیزا اندازه‌گیری شدند. تمام اصول کار با حیوانات طبق اصول بیانیه هلسینکی (Helsinki) سال ۲۰۰۸ و کمیته اخلاق وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی-دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان کرمان به شماره IR.KMU.REC.1396.1562 انجام شد. جهت مقایسه گروه کنترل با دو دوز مختلف آب اکسیژنه از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و جهت مقایسه گروه‌ها در هر یک از دوزهای اعمال

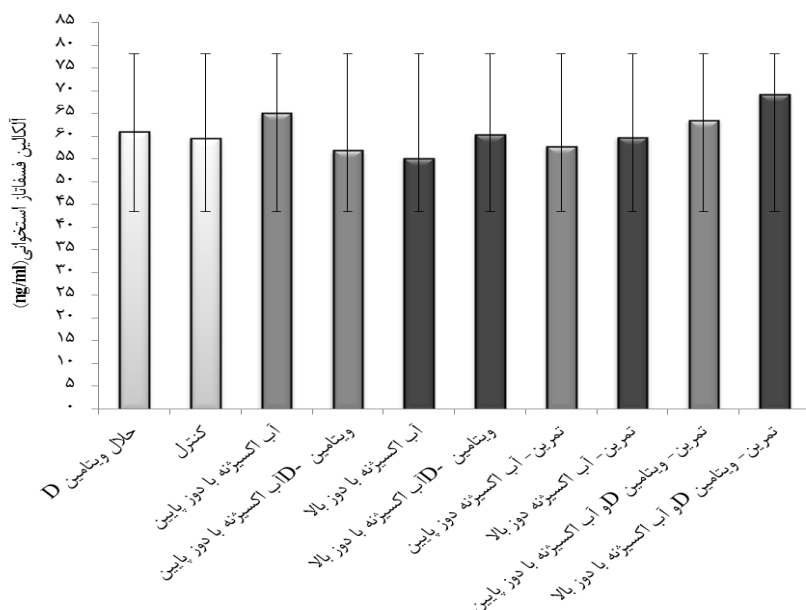


### نمودار ۱. میانگین و انحراف استاندارد استئوکلسین در گروه‌های دهگانه تحقیق

\* تفاوت معنادار با گروه تمرین با آب اکسیژنه با دوز پایین ( $P=0.0001$ ) و گروه ویتامین دی با آب اکسیژنه با دوز پایین ( $P=0.003$ )

جدول ۲. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه جهت مقایسه سطوح متغیرهای تحقیق در گروه‌های آب اکسیژنه، آب اکسیژنه دو برابر، شام و

استئوکلسین	عامل	مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
کنترل	بین گروهی	۹/۸۰	۳	۴/۹۰	۱/۱۵	۰/۳۵
	دورن گروهی	۴۰/۴۷	۱۶	۳/۳۷		
	کل	۵۰/۲۷	۱۸			
آلکالین فسفاتاز	بین گروهی	۲۵۱/۴۵	۳	۱۲۵/۷۲	۰/۷۵	۰/۵۳
	دورن گروهی	۱۶۶۵/۵۱	۱۶	۱۳۸/۷۹		
	کل	۱۹۱۶/۹۷	۱۸			



نمودار ۲. میانگین و انحراف استاندارد آلکالین فسفاتاز استخوانی در گروه های دهگانه تحقیق

سطوح سرمی استئوکلسین موش های صحرایی مسموم شده با دوز ۱ mmol/kg داشت ( $p=0/001$ ,  $F=0/01$ ). اندازه اثر (۰/۷۶)، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی در نمودار ۱ قابل مشاهده می باشد؛ تمرین هوازی ( $p=0/95$ ,  $F=0/003$ ) و اندازه اثر (۰/۰۱) و ویتامین D ( $p=0/47$ ,  $F=0/53$ ) و اندازه اثر (۰/۰۳) و تعادل آنها ( $p=0/53$ ,  $F=0/41$ ) و اندازه اثر (۰/۰۲) نیز اثر معنی داری بر کاهش سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز موش-های صحرایی مسموم شده با دوز ۱ mmol/kg نداشت (جدول ۳).

نتایج آزمون آنالیز واریانس دو طرفه جهت بررسی اثرات تعاملی تمرین هوازی و مکمل یاری ویتامین D بر سطوح استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز موش های صحرایی مسموم شده با دوز های ۱ mmol/kg، ۲ و ۳ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در جدول ۳ نشان می دهد هشت هفته تمرین هوازی ( $p=0/54$ ,  $F=0/37$ ) و اندازه اثر (۰/۰۲) و ویتامین D ( $p=0/96$ ,  $F=0/002$ ) و اندازه اثر (۰/۰۱) اثر معنی داری بر سطوح سرمی استئوکلسین موش های صحرایی مسموم شده با دوز ۱ mmol/kg ندارد؛ ولی هشت هفته تمرین هوازی و ویتامین D اثر تعاملی بر افزایش

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه جهت بررسی متغیر های تحقیق

اندازه اثر	سطح معنی داری	F	df	مجموع مربعات	عامل
۰/۰۲	۰/۵۴	۰/۳۷	۱	۰/۷۴	تمرین هوازی
۰/۰۰۱	۰/۹۶	۰/۰۰۲	۱	۰/۰۰۴	ویتامین D
۰/۷۶	*۰/۰۱	۶/۸۲	۱	۱۳/۳۴	تمرین هوازی و ویتامین D
۰/۰۰۱	۰/۹۵	۰/۰۰۳	۱	۰/۵۲	تمرین هوازی
۰/۰۳	۰/۴۷	۰/۵۳	۱	۹۷/۷۲	ویتامین D
۰/۰۲	۰/۵۳	۰/۴۱	۱	۷۴/۴۵	تمرین هوازی و ویتامین D
۰/۳۸	**۰/۰۰۶	۹/۹۵	۱	۴۰/۷۱	تمرین هوازی
۰/۰۰۲	۰/۸۶	۰/۰۳	۱	۰/۱۲	ویتامین D
۰/۰۸	۰/۲۳	۱/۵۵	۱	۶/۳۵	تمرین هوازی و ویتامین D
۰/۰۷	۰/۲۶	۱/۳۳	۱	۲۲۷/۴۰	تمرین هوازی
۰/۰۹	۰/۲۲	۱/۵۷	۱	۲۶۹/۰۸	ویتامین D
۰/۰۰۹	۰/۷۱	۰/۱۳	۱	۲۳/۴۵	تمرین هوازی و ویتامین D

\* تمرین هوازی و ویتامین D اثر تعاملی بر افزایش سطوح سرمی استئوکلسین موش های صحرایی مسموم شده آب اکسیژنه داشت ( $p=0/001$ ).  
\*\*تمرین هوازی موجب افزایش معنی داری بر سطوح سرمی استئوکلسین موش های صحرایی مسموم شده آب اکسیژنه دو برابر شد ( $p=0/006$ ).

حاکمی از اثرات نامطلوب وضعیت رادیکال آزاد بر استخوان است. از آنجا که تاکنون پژوهشی به بررسی اثر برون زاد پراکساید هیدروژن بر استخوان نپرداخته است، لذا این پژوهش از این حیث اولین پژوهش است.

هشت هفته تمرین هوازی اثر معنی داری بر افزایش سطوح سرمی استئوکلسین موش‌های صحرایی مسموم شده با  $H_2O_2$  با دوز ۲ mmol/kg دارد ولی هشت هفته تمرین هوازی اثر معنی داری بر کاهش سطوح سرمی استئوکلسین و آلکالین-فسفاتاز موش‌های صحرایی مسموم شده با دوز ۱ mmol/kg ندارد. ثابت شده است که فعالیت بدنی قادر است عمل آنابولیک به استخوان اعمال کند و این عمل از طریق تحریک عمل استخوان سازی به وسیله برخی عوامل هورمونی از جمله استئوکلسین صورت می گیرد. همچنین به نظر می رسد یکی از مکانیسم‌های اصلی که از طریق آن تمرین ورزشی موجب افزایش سطوح استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز می گردد فعالیت بیشتر سلول‌های استخوانی و پاسخ به فشارهای مکانیکی ناشی از ورزش می باشد. با توجه به اینکه محققین استخوان را یک بافت متابولیکی فعال می دانند، در هنگام فعالیت ورزشی سیگنال‌های ناشی از تغییرات انسولین و گلوکز منجر به فعالیت بیشتر سلول‌های استخوانی و تحریک ترشح استئوکلسین می شود (۲۹-۱۱). همراستا با مطالعه حاضر سه جلسه تمرینات ایروبیک و پیاده روی در ده هفته به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه با شدت ۴۵ تا ۶۰ درصد ضربان قلب موجب افزایش سطوح استئوکلسین زنان یائسه دیابتی گردید (۱۱)؛ هشت هفته سه جلسه ای در هفته به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه با شدتی معادل ۶۵ تا ۷۰ درصد ضربان قلب موجب افزایش معنی دار سطوح کلسیم و استروژن گردید ولی اثر معنی داری بر تغییرات آلکالین فسفاتاز سرمی زنان چاق مبتلا به یائسگی زودرس نداشت (۱۲)؛ ده هفته، سه جلسه در هفته و هر جلسه ۴۵ تا ۶۰ دقیقه تمرین هوازی با شدت ۵۰-۶۵ درصد ضربان قلب اثر معنی داری بر سطوح سرمی استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز مردان دیابتی نداشت (۱۰)، این مطالعه از نظر افزایش سطوح سرمی استئوکلسین در موش‌های صحرایی مسموم شده با  $H_2O_2$  با دوز ۲ mmol/kg همسو بود ولی با دوز ۱ mmol/kg همسو نبود. از دلایل ناهمسویی در این دوز را می توان تفاوت در جامعه آماری دانست. ۱۲ هفته، سه جلسه در هفته و هر جلسه ۵۰-۶۰ دقیقه تمرین هوازی پیاده روی و دوی سبک با شدت ۶۵ تا ۷۰ درصد ضربان قلب موجب افزایش بیان ژنی سطوح آلکالین فسفاتاز سرمی در زنان یائسه کم تحرک گردید (۲۹)، این مطالعه با مطالعه حاضر همسو نبود، از دلایل ناهمسویی این دو مطالعه می توان به تفاوت در

تمرین هوازی ( $p=0/006$ ,  $F=9/95$  و اندازه اثر  $0/38$ ) موجب افزایش معنی داری بر سطوح سرمی استئوکلسین موش‌های صحرایی مسموم شده با دوز ۲ mmol/kg شد، اما ویتامین D ( $p=0/86$ ,  $F=0/03$  و اندازه اثر  $0/02$ ) و اثر تعاملی تمرین هوازی و ویتامین D ( $p=0/23$ ,  $F=1/55$  و اندازه اثر  $0/08$ ) بر استئوکلسین موش‌های صحرایی مسموم شده با دوز ۲ mmol/kg معنی دار نبود؛ همانند دوز اول در دوز دوم نیز تأثیر تمرین هوازی ( $p=0/26$ ,  $F=1/33$  و اندازه اثر  $0/07$ )، ویتامین D ( $p=0/22$ ,  $F=1/57$  و اندازه اثر  $0/09$ ) و تعامل تمرین هوازی و ویتامین D بر آلکالین فسفاتاز معنی دار نبود ( $p=0/71$ ,  $F=0/13$  و اندازه اثر  $0/09$ ) (جدول ۳).

## • بحث

نتایج نشان داد تزریق  $H_2O_2$  با دوز های ۱ و ۲ mmol/kg اثر معنی داری بر کاهش سطوح سرمی استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز موش‌های صحرایی ندارد. حیات فیزیولوژی سلول به نسبت بین سطوح ROS و آنتی اکسیدان‌ها وابسته است. گونه‌های فعال اکسیژن که شامل آنیون سوپراکسید ( $O_2^-$ ) هیدروکسی رادیکال (OH) و هیدروژن پراکساید ( $H_2O_2$ ) هستند، طی کاتابولیسم فلزات در بدن تولید می شوند و موجب اختلال در روند آنزیم‌هایی چون NADPH oxidase و SOD می شوند (۷). مطالعات اخیر نشان می دهند آسیب اکسیداتیو با ایجاد تغییرات دائمی در ماده ژنتیکی اولین مرحله در شروع جهش، سرطان و پیری است (۲۴) و با مکانیسم پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن‌ها (MAPK mitogen-activated protein kinase) از جمله کینازهای فعال شده‌ی خارج سلولی ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases)، JNK و p38 موجب مرگ برنامه ریزی شده (apoptosis) در استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها می شود (۷). در تایید یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر عدم تأثیر  $H_2O_2$  بر متغیرهای تحقیق می توان این گونه بیان نمود که پاسخ سلول‌ها به پراکسید هیدروژن متفاوت است و عوامل تأثیرگذار در این امر می تواند غلظت کاتالاز، توانایی تعمیر DNA، مقدار تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و روش قرار گرفتن در معرض  $H_2O_2$  باشد (۲۵). همسو با پژوهش حاضر محققین بیان کردند که غلظت  $0/3$  میلی مول  $H_2O_2$  موجب افزایش فعالیت پروتئین آلکالین فسفاتاز در ماتریکس میتوکندری سلول‌های کشت شده انسانی گردید (۲۵)؛ از طرفی قرار گرفتن سلول در معرض  $0/1$  و  $0/3$  میکروگرم برلیتر به مدت ۳۰ دقیقه موجب کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز گردید (۲۶)؛ ۴۰۰ میکرومول  $H_2O_2$  به مدت ۴ ساعت موجب کاهش آنزیم‌های استئوبلاست در سلول‌های کشت شده گردید (۲۷)؛ لذا پژوهش‌های مذکور

جامعه آماری، شیوه اندازه‌گیری و مدت زمان تمرینات اشاره نمود.

هشت هفته دریافت مکمل ویتامین D اثر معنی‌داری بر تغییرات سطوح سرمی استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز موش-های صحرایی مسموم شده با دوز ۱ و ۲ mmol/kg ندارد. ویتامین D یک استروئید ترشحی است که در پوست سنتز می‌شود و متعاقباً به ترتیب در کبد و کلیه متابولیزه می‌شود. عملکرد آن تنظیم هموستاز کلسیم و فسفر و کمک به مینرالیزاسیون استخوان می‌باشد (۲۹) محققین نشان دادند با افزایش سن ظرفیت تولید ویتامین D توسط پوست کاهش می‌یابد. همچنین اختلالاتی در سیستم هورمونی بدن دیده می‌شود که از جمله آنها اختلال در مسیر متابولیسم ویتامین D می‌باشد (۱۵). ویتامین D موجب افزایش جذب فسفر و کلسیم از روده‌ها و کاهش دفع آن‌ها از کلیه شده و فرآیند استخوان‌سازی را قوت می‌بخشد (۳۰). استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز نیز از پروتئین‌های شناخته شده متابولیسم سلولی است که به طور مستقیم توسط هورمون‌های تنظیم کننده کلسیم از جمله کلسی‌تونین، هورمون پاراتیروئید و ویتامین D قرار دارد (۳۰). به نظر می‌رسد ویتامین D با افزایش فعالیت سلول‌های استئوبلاست از مسیر سیگنالی افزایش جذب ویتامین K و افزایش معدنی شدن استخوان موجب افزایش بیان استئوکلسین در بافت استخوان شوند (۱۱) با بررسی مطالعات می‌توان به این نتیجه رسید، تغییرات آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین متعاقب مصرف ویتامین D به دوز مصرفی وابسته است در همین راستا محققین به این نتیجه رسیدند که دریافت ۴۰۰ IU/KG در روز به مدت ۱۵ روز اثر معنی‌داری بر افزایش سطوح آلکالین فسفاتاز نوزادان نارس یک ماه پس از تولدشان نداشت. ولی دریافت ۲۰۰ و ۸۰۰ IU/KG موجب افزایش آلکالین فسفاتاز در این نوزادان گردید دریافت IU/KG ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ موجب افزایش سطوح استئوکلسین نوزادان نارس یک ماه پس از تولدشان گردید (۳۱)، از دلایل ناهمسویی این یافته با یافته‌ی مطالعه حاضر می‌توان به تفاوت در دوز مصرفی مکمل ویتامین D، تفاوت در مدت زمان مصرف و همچنین تفاوت در جامعه آماری اشاره نمود؛ دریافت IU ۶۰۰ ویتامین D در روز موجب افزایش هورمون پاراتیروئید و آنزیم آلکالین فسفاتاز زنان یائسه گردید (۳۲) این مطالعه نیز با مطالعه حاضر ناهمسو بود و از دلایل ناهمسویی می‌توان به تفاوت در جامعه آماری و همچنین سطوح پایه آلکالین فسفاتاز اشاره نمود، همچنین با توجه به تأثیر سن بر بیومارکرهای استخوان و عدم تأثیر معنی‌دار آب اکسیژنه بر سطوح آلکالین-

فسفاتاز و استئوکلسین را نیز می‌توان از دلایل ناهمسویی دانست.

هشت هفته تمرین هوازی و استفاده از مکمل ویتامین D دارای اثر تعاملی بر کاهش سطوح سرمی استئوکلسین موش-های صحرایی مسموم شده با دوز ۱ mmol/kg در موش‌های صحرایی می‌باشند ولی دارای اثرات تعاملی در افزایش سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز موش‌های صحرایی مسموم شده با دوز ۲ mmol/kg نمی‌باشند. مطالعات نشان می‌دهند سنجش میزان زیست شاخص‌های استخوانی با روش‌های غیر تهاجمی، ارزان و حتی قابل تکرار ظرف مدت کوتاه می‌تواند راه مناسبی برای پیش‌بینی تغییرات توده استخوانی باشند، از این رو اندازه‌گیری سطوح آلکالین فسفاتاز می‌تواند اطلاعاتی در مورد تکمیل فرآیند استخوانی شدن استخوان تازه تشکیل شده و نیز ساخت استئوئیدها ارائه کنند (۳۳). بخشی از کنترل متابولیسم استخوان که مورد فشار مکانیکی قرار می‌گیرد، تحت تأثیر عوامل شیمیایی است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد فعالیت‌های ورزشی باعث افزایش تراکم استخوان اسفنجی و تراکم در اندام‌های فوقانی و تحتانی می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی می‌توانند موجب تغییر در غلظت کلسیم و هورمون پاراتیروئید سرم و پلازما شود. هورمون پاراتیروئید با فعال نمودن استئوکلاست‌ها و جذب کلسیم از استخوان‌ها، افزایش بازجذب کلسیم از توبول‌های کلیوی و بلاخره افزایش تبدیل ویتامین D به شکل فعال آن یعنی ۲۵ و ۱ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول در کلیه‌ها سبب تسهیل جذب کلسیم از روده می‌شود (۳۲)، با این وجود عده‌ای از محققین بر این باورند که افزایش تولید ROS متعاقب فعالیت‌های ورزشی، ممکن است روند پیری را سرعت بخشد و افزایش سن نیز خود تولید گونه‌های اکسیژن فعال را افزایش می‌دهد (۱۹)، از همین رو به نظر می‌رسد تمرین هوازی و مکمل ویتامین D اثرات تعاملی خود را بر کاهش سطوح استئوکلسین با مکانیسم مذکور در موش‌های مسموم شده با دوز ۱ mmol/kg گذاشته باشد. مطالعات پیشین نشان دادند، ۶ ماه تمرین ترکیبی و دریافت IU ۶۰۰ ویتامین D در روز دارای اثر تعاملی در افزایش سطوح آلکالین فسفاتاز زنان یائسه بود (۳۲)؛ نه هفته، سه جلسه در هفته تمرین هوازی به مدت ۳۰ دقیقه و دریافت ۱ ug/kg ویتامین D در روز موجب افزایش بیومارکرهای استخوان از جمله استئوکلسین در موش‌های صحرایی اورکتومی شده گردید (۳۴)؛ هشت هفته، سه جلسه در هفته و هر جلسه تمرین مقاومتی با شدت ۶۰ تا ۸۰ درصد یک تکرار بیشینه و مصرف همزمان مکمل کلسیم و فسفر اثر معنی‌داری بر سطوح استئوکلسین، آلکالین فسفاتاز،

کاتابولیسمی مربوط به سوخت و ساز استخوان مانند NTX (به عنوان ماده‌ی به دست آمده از تجزیه کلاژن ماتریکس میتوکندری، تولیدی توسط فعالیت بازجذب استئوکلاست‌ها و مبین تخریب بافت) و BSALP (به عنوان ایزوآنزیم اختصاصی در تبیین میزان فعالیت سنتزی استخوان) نیز پرداخته شود. همچنین با توجه به نتایج مطالعه حاضر مبنی بر معنی دار نبودن اثرات  $H_2O_2$  با دوزهای ۱ و ۲ mmol/kg بر متغیرهای تحقیق پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی در کنار گروه‌های مسمومیت با  $H_2O_2$  گروه‌های تمرین، مکمل ویتامین D و گروه تمرین و مکمل ویتامین D در کنار گروه‌های تحقیق جهت اطمینان بیشتر از تأثیرات هر یک از این مداخله‌ها به طور مجزا قرار داده شود. علاوه بر این با توجه نتایج مطالعه حاضر مبنی بر معنی دار نبودن  $H_2O_2$  با دوزهای ۱ mmol/kg و ۲ در سطوح سرمی استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز عدم اندازه‌گیری میزان بیان ژنی این متغیرها در سلول‌های استخوانی نیز از دیگر محدودیت‌های تحقیق حاضر به شمار می‌آیند. همچنین پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی سطوح بیان ژنی استئوکلسین، آلکالین فسفاتاز و دیگر نشان‌گرهای تشکیل استخوان در سطح سلولی در موش‌های صحرایی با القا مسمومیت با دیگر دوزهای  $H_2O_2$  یا مدت زمان بیشتر القا استرس اکسیداتیو به این روش بررسی گردد. بررسی تأثیر تعامل تمرین و ویتامین D در گروه‌هایی بدون القا مسمومیت در کنار سایر گروه‌ها می‌تواند پیشنهادی به دیگر محققین باشد. به نظر می‌رسد تمرینات هوازی و مصرف همزمان مکمل ویتامین D موجب بهبود برخی از نشانگرهای تشکیل استخوان در موش‌های صحرایی مسموم شده با  $H_2O_2$  گردد. با این وجود تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

کلسیم در مردان سالمند غیر ورزشکار داشت (۳۵)؛ لازم به ذکر است یافته‌های مطالعات ذکر شده با یافته مطالعه حاضر در مورد اثرات تعاملی تمرین هوازی و ویتامین D در موش‌های صحرایی مسموم شده با دوز ۱ mmol/kg ناهمسو می‌باشند. از دلایل ناهمسوایی این مطالعات با مطالعه حاضر را می‌توان تفاوت در سطوح اولیه اندازه‌گیری شده متغیرهای تحقیق و روش متفاوت القا استرس اکسیداتیو در این مطالعه و بررسی سطوح نشان‌گرهای تشکیل استخوان اشاره نمود. علی‌رغم بررسی‌های فراوان مطالعات انجام شده در زمینه اثرات تعاملی ورزش و ویتامین D بر استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز محدود بودند، به همین خاطر کمبود منابع در مقایسه این مطالعه با مطالعات دیگر از محدودیت‌های تحقیق به شمار می‌آید. از سویی به نظر می‌رسد آلکالین فسفاتاز جهت معدنی نمودن توده استخوان ضروری است و این مهم با اتصال به گیرنده موجود در غشای سیتوپلاسمی استئوبلاست و ایفای نقش به عنوان اکتوآنزیم انجام می‌شود. اما از آنجا که قسمت‌های مختلف دیگری از بدن مانند کبد، کلیه‌ها، روده و سایر نسوج در مقادیر این آنزیم در سرم خون دخالت دارند، سنجش میزان این آنزیم به تنهایی به عنوان روشی غیراختصاصی، برای روشن نمودن وضعیت فعالیت آنابولیسی استخوان، استفاده‌ی محدودی دارد، هر چند هنوز در بررسی‌های بالینی سوخت و ساز استخوان، در بیماران این شاخص به صورت معمول ارزیابی می‌شود و افزایش این آنزیم در سرم تا حدودی می‌تواند نشان دهنده‌ی اثرات مثبت مداخلات صورت گرفته بر نحوه‌ی استئوبلاست‌ها باشد (۳۳)، از این رو با توجه به نتایج مطالعه حاضر مبنی بر عدم معنی دار نبودن اثرات تعاملی این دو مداخله (تمرین هوازی و مکمل یاری ویتامین D) بر سطوح آلکالین فسفاتاز پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی به اندازه‌گیری میزان دقیق فعالیت‌های آنابولیسمی و

## • References

- Zhu S, Wei W, Liu Z, Yang Y, Jia H. Tanshinone IIA attenuates the deleterious effects of oxidative stress in osteoporosis through the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol Med Rep* 2018; 17(5): 6969-6976.
- Kadam NS, Chiplonkar SA, Khadilkar AV, Khadilkar VV. Prevalence of osteoporosis in apparently healthy adults above 40 years of age in Pune City, India. *Indian J Endocr Metab [serial online]* 2018; 22: 67-73.
- Yang S Y, Lee S-H, Tai B H, Jang H-D, Kim Y H. Antioxidant and Anti-Osteoporosis Activities of Chemical Constituents of the Stems of *Zanthoxylum piperitum*. *Molecules* 2018; 23: 457.
- Rasolifard M H, Nozohor Y. The Effect of Aqueous Extract of White Tea on the Levels of Antioxidant Enzymes of Rats' Liver Tissue Exposed to Arsenic. *sjimu*. 2018; 25(5): 146-153. [In Persian].
- Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med* 2009; 15: 468-477.
- Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/ anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int* 2008; 28: 317-321.
- Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi M L, Vincenzini M T. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2017; 14(2): 209-216.
- Baharara J, Haddad F, Shariatzadeh M, Razavi T. Genotoxic effect of hydrogen peroxide on bone marrow erythrocytes of female Balb/C mouse. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2008; 10 (3) :17-22. [In Persian].



9. Regnier JF, Molinier B, Bently KS, Gerlache DE. Micronucleus tests in mice with hydrogen peroxide. *Fundam Appl Toxicol*. 1996; 30(1): 233.
10. Khorshidi D, Matinhomae H, Azarbayjani MA, Hossein-nezhad A. Effect of One Period of Aerobic Exercise on Serum Levels of Alkaline Phosphatase and Osteocalcin in Patients with Type 2 Diabetes. *JSSU* 2011; 19 (5): 676-85. [In Persian].
11. Ghorbanian B, Barani A. Study the Effect of Exercise on Bone Markers, Glycemic and Anthropometric Indices in Postmenopausal Women with Diabetes. *J Arak Uni Med Sci* 2017; 20 (1): 107-117. [In Persian].
12. Fathi M, Attarzadeh Hosseini S, khair abadi S, Hejazi K. Effect of eight Weeks Aerobic Training on Serum parathormone, estrogen and Alkaline phosphatase concentration in obese women with premature menopause. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* 2017; 20(7): 8-17. [In Persian].
13. Pourfazel B, Azamian Jazi A, Faramarzi M, Mortazavi S M J. Effect of regular aerobic training on oxidative damage markers of lipids and proteins in rats exposed to radiation emitted by the Wi-Fi router. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences*. 2017; 5 (2): 11-19. [In Persian].
14. Ghasemalipour H, Eizadi M. The Effect of Aerobic Training on Some Bone Formation Markers (Osteocalcin, Alkaline Phosphatase) in Asthma Treated with Inhaled Corticosteroids, *Zahedan J Res Med Sci*. 2018; 20 (1): 58477. [In Persian].
15. Taene A, Niazi S, Bijari B, Esmaeili S, Anani Sarab G. Prevalence of vitamin D deficiency and its related factors in AqQala city in 2016. *J Birjand Univ Med Sci* 2017; 24 (2): 108-116. [In Persian].
16. Fasihi F, Alavi-Naeini A, Najafi M, Aghaye Ghazvini M R, Hasanazadeh A. The effects of vitamin D supplementation on the antioxidant serum level in 6-13 years old children with ADHD. *Tehran Univ Med J*. 2017; 75 (8): 600-608. [In Persian].
17. Mustafa R, Alfky N, Hijazi H, Header E, Azzeh F. Biological effect of calcium and vitamin D dietary supplements against osteoporosis in ovariectomized rats. *PN [Internet]*. 2018; 20(1): 86-3.
18. Elkhamisy E A. Effect of Diet with Dried Plum, Calcium and Vitamin D on Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2014; 9 (2): 220-227.
19. Ghahremani Moghaddam M. The role of physical activity in oxidative damage and anti-oxidant status in elderly people: A review of mechanisms. *MJMS* 2017; 20 (3):1-16 [In Persian].
20. 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.
21. 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.
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.
23. 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.
24. Heyat F. Cellular and Molecular Mechanisms of the Production of Free Radicals during Exercise and Their Function on Skeletal Muscles. *J Fasa Univ Med Sci* 2017; 7 (1): 1-11. [In Persian].
25. Baharara J, Haddad F, Shariatzadeh M, Razavi T. Genotoxic effect of hydrogen peroxide on bone marrow erythrocytes of female Balb/C mouse. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2008; 10 (3): 17-22. [In Persian].
26. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H2O2) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2006; 22(1): 39-46.
27. Soares DG, Gonçalves B F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent*. 2015; 43(6): 750-6.
28. Lv M, Liu Y, Xiao T-H, Jiang W, Lin B-W, Zhang X-M, et al. GYY4137 stimulates osteoblastic cell proliferation and differentiation via an ERK1/2-dependent antioxidant mechanism. *Am J Transl Res* 2017; 9(3): 1183-1192.
29. Tartibian B, Sheikhlou Z, Malandish A, Rahmati-Yamchi M, Afsar Garebag R. Effect of moderate-intensity aerobic training on alkaline phosphatase gene expression and serum markers of bone turnover in sedentary postmenopausal women. *Tehran Univ Med J* 2017; 74 (10): 723-734. [In Persian].
30. Atena R. The effects of vitamin "D" on protein adiponectin and inflammation: The narrative review. *Clin Exc* 2016; 5 (1): 50-64.
31. Kislal FM, Dilmen U. Effect of different doses of vitamin D on osteocalcin and deoxypyridinoline in preterm infants. *Pediatr Int* 2008; 50 (2): 204-7.
32. Hassanzadeh H, Gozashti M, Dekhoda M, Kazemi A. The Effect of Calcium and Vitamin D Consumption and Combined Training on Parathyroid Hormone and Alkaline Phosphatase of Postmenopausal Women. *Medical journal of Mashhad university of medical sciences* 2012; 55(2): 96-101. [In Persian].
33. Rezaei N, torkaman G, movasseghe S, hedayati M, bayat N. The Comparison of 6-Week Resistance Training and Pulsed Electromagnetic Field on Talp, Ca, P, Cortisol, and Anthropometric Parameters in Osteoporotic Postmenopausal Women. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012; 14 (4): 380-391. [In Persian].
34. Khalil A, Youssef G A. Effect of Aerobic Exercise, Vitamin K and Vitamin D on Bone Metabolism in Ovariectomized Adult Rats. *Nature and Science*. 2015; 13(1)
35. Khodkaran M H, Hosseini A, Ghasemi A. Effect of resistance training and intake of calcium and phosphorous on bone density of the nonathletic adolescents. *European Journal of Experimental Biology* 2014; 4(5): 72-75.

## The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercise and Vitamin-D Supplementation on Osteocalcine and Alkaline Pphosphatase in Rats Poisoned with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Shariati M<sup>1</sup>, Azarbayjani MA<sup>\*2</sup>, Kaka Gh<sup>3</sup>, Zilaei Bouri Sh<sup>4</sup>

1- PhD Candidate of Exercise physiology, Shoushtar Branch, Islamic Azad University (I.A.U), Shoushtar, Iran

2- Corresponding author: Professor of Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University (I.A.U), Tehran, Iran. Email: m\_azarbayjani@iauctb.ac.ir

3- Associate Professor of Neurosciences Research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant professor of Department of Physical Education & Sport Sciences , Masjed-Soleiman Branch, Islamic Azad University (I.A.U), Masjed-Soleiman, Iran

Received 14 Aug, 2018

Accepted 25 Nov, 2018

**Background and Objectives:** Osteoporosis is one of the bone diseases that various factors such as oxidative stress have a role in creating it. The current research aimed to examine the synchronous effect of aerobic physical exercise and Vitamin D supplementation on osteocalcine and alkaline phosphatase in rats poisoned by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Materials & Methods:** Sixty adult male Wistar rats were randomly divided into 10 groups of six-rat including: (1) received hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (2) double quantity of hydrogen peroxide; (3) hydrogen peroxide + vitamin-D; (4) hydrogen peroxide + aerobic exercise; (5) hydrogen peroxide+ vitamin-D+ aerobic exercise; (6) Double- content hydrogen peroxide + vitamin-D; (7) double-content hydrogen peroxide + aerobic exercise; (8) double-content hydrogen peroxide + vitamin-D + aerobic exercise; (9) scheme (dimethyl sulfoxide + normal saline) and (10) control group, and were treated under intervention protocol for 8 weeks. The serum levels of osteocalcine and alkaline phosphatase were measured by ELISA method. One-way ANOVA was utilized to examine the possible difference between the hydrogen peroxide, double-content hydrogen peroxide, and scheme and control groups and also in order to determine the interactive effects of aerobic exercise and vitamin-D on the research variables, Two-way ANOVA and Bonferroni posthoc test were employed (p≤0.05).

**Results:** Conducting aerobic exercise and vitamin-D supplementation for eight weeks had interactive effect on the significant rise of osetocalcine levels in the rats poisoned with 1mm.mol/kg (p=0.001); aerobic exercise (p=0.006) increased significantly the serum levels of osteocalcine in comparison with the groups not treated by aerobic exercise in the rats poisoned with 2mm.mol/kg.

**Conclusion:** It seems that both exercise and Vitamin-D supplementation improve symptoms of osteogenesis. Nevertheless, with respect to the insignificant effect of hydrogen peroxide on research variables, conducting further studies is necessary.

**Keywords:** Aerobic Exercise, Vitamin D, Osteocalcin, Alkaline Phosphatase, Hydrogen Peroxide