University of Birjand

*Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport* *Research Paper*
*Fall & Winter 2020, 8(16), 86-100*
*Received: Feb 6, 2019* *Accepted: Oct 13, 2019*

# Effects of aerobic exercise and vitamin D supplementation on the expression of apoptosis genes BCL2, BAX, Caspase3 and BCL2/BAX ratio on lung in male rats exposed to hydrogen peroxide

**Somayeh Ramezani[1], Maghsoud Peeri[2*], Mohammad Ali Azarbaijani[2], Firouzeh Dehghan[1]**

1. PhD in Exereise Physiology, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Full Professor, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**Abstract**

**Background and Aim:** Exercise is a strong physiological stimulus that can affect the lung apoptosis by in fluencing a number of extracellular and intracellular signaling pathways, directly or indirectly. This study was designed to determine the effects of aerobic exercise training alongside vitamin D supplementation on the expression of apoptosis genes BCL2, BAX, Caspase3 and BCL2/BAX ratio on lung cell apoptosis in male rats exposed to hydrogen peroxide ($H_2O_2$). **Materials and Methods:** Fourty eight male rats were randomly assigned into 6 groups (n=8) including control, hydrogen peroxide (2H), hydrogen peroxide + vitamin D (2HD), hydrogen peroxide + aerobic exercise (2HE), hydrogen peroxide + vitamin D + aerobic exercise (2HDE), and dimethyl sulfoxide (DMSO) groups. For the purpose of inducing apoptosis, 2 mmol/kg of $H_2O_2$ was injected three times per week one hour prior to the exercise session. The rats were slaughtered 24 hours following the termination of the exercise sessions and the lung tissue was exposed and stored at -75°C. Then, the RT-PCR method was employed to examine the gene expressions of BAX, BCL2, Caspase3 and BCL2/BAX ratios. It is applied one and two- way analysis of variance and Thuky tests for analysis of data at the significant level of $p<0.05$. **Results:** BCL2 expression in the 2HE group ($p=0.004$) and 2HD ($p=0.006$) increased significantly compared to the control group. While the expression of BAX, BCL2/BAX ratio, Caspase3 in the 2HE and 2HD significantly ($p<0.05$) was lower than the control group. On the other hand, 2HDE had a decline effect on BAX gene expression ($p=0.03$) and BCL2/BAX ratio ($p=0.04$), but did not show significant effect on expression of BCL2 and Caspase3 gene ( $p>0.05$). **Conclusion:** It seems that that one course of regular aerobic exercise in addition to consuming vitamin D might is likely to cause significant alteration on the expression of genes involved in apoptosis caused by $H_2O_2$ presence can be used as a complementary therapy along with other treatments for apoptosis in lung tissue.

**Key words:** Apoptosis, Vitamin D, Oxidative stress, Aerobic exercise.

***Corresponding Author, Address: Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran;**
**Email: m.peeri@iauctb.ac.ir** **DOI: 10.22077/JPSBS.2019.1818.1455**

نشریه مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش  مقاله پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۹۹، دوره ۸، شماره ۱۶، ، ص ۱۰۰-۸۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷  تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۱
دانشگاه بیرجند

# تاثیر تمرین هوازی به همراه مکمل یاری ویتامین D بر بیان ژن های آپوپتوزیس BCL2، BAX، کاسپاز-۳ و نسبت BCL2/BAX در ریه رت های نر مسموم شده با آب اکسیژنه

سمیه رمضانی[۱]، مقصود پیری[۲*]، محمد علی آذربایجانی[۲]، فیروزه دهقان[۱]

۱. دکترای فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.
۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

## چکیده

**زمینه و هدف**: ورزش یک محرک فیزیولوژیک قوی است که می تواند با تاثیر بر روی تعدادی از مسیرهای پیام دهی خارج سلولی و داخل سلولی به طور مستقیم یا غیرمستقیم بر روند آپوپتوزیس ریه اثرگذار باشد. هدف تحقیق حاضر، بررسی تاثیر تمرین هوازی و ویتامین D بر بیان ژن های آپوپتوزیس کاسپاز-۳، BCL2، BAX و نسبت BCL2/BAX در ریه رت های نر مسموم شده با آب اکسیژنه بود. **روش تحقیق**: در این مطالعه ۴۸ سر موش نر بالغ ویستار به روش تصادفی به ۶ گروه (هر گروه ۸ موش) شامل آب اکسیژنه دو برابر (2H)؛ $2H_2O_2$ + ویتامین $D_3$ (2HD)؛ $2H_2O_2$ + تمرین ورزشی (2HE)؛ $2H_2O_2$ + $D_3$ + E (2HDE)؛ دی متیل سولفوکساید (DMSO)، و کنترل (C) تقسیم شدند. جهت القای آپوپتوزیس تزریق درون صفاقی $H_2O_2$ با دوز ۲ میلی مول/کیلوگرم به صورت ۳ بار در هفته و یک ساعت قبل از تمرین انجام شد. همچنین ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، رت ها قربانی و نمونه های بافتی آن ها جدا شده و در دمای ۷۵°C- نگهداری شدند. سپس  با استفاده از روش RT-PCR، بیان ژن های کاسپاز-۳،  BAX، BCL2 و نسبت BAX/BCL2 بافت ریه مورد سنجش قرار گرفت. با استفاده از آزمون های تحلیل واریانس یک راهه و دو راهه و آزمون توکی در سطح معنی داری p<۰/۰۵؛ داده ها تجزیه و تحلیل شدند. **یافته ها**: بیان ژن BCL2 درگروه 2HE (p=۰/۰۰۴) و 2HD (p=۰/۰۰۶) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری پیدا کرد؛ در حالی که بیان ژن BAX، BCL2/BAX و کاسپاز-۳ در گروه 2HE و 2HD به طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) کمتر از گروه کنترل بود. از طرف دیگر، 2HDE اثر کاهنده بر بیان ژن BAX (p=۰/۰۳) و نسبت BCL2/BAX (p=۰/۰۴) داشت؛ در حالی که بر بیان ژن BCL2 و کاسپاز ۳ اثر معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). **نتیجه گیری**: به نظر می رسد که یک دوره تمرین هوازی همراه با مکمل یاری ویتامین D با تغییرات معنی دار در بیان ژن های دخیل در آپوپتوزیس ناشی از $H_2O_2$ می توانند به عنوان یک روش درمانی مکمل در کنار سایر روش ها، برای تعدیل در آپوپتوزیس بافت ریه کار گرفته شوند.

**واژه های کلیدی**: آپوپتوزیس، ویتامین D، استرس اکسیداتیو ، فعالیت هوازی.

*نویسنده مسئول، آدرس: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، گروه فیزیولوژی ورزشی؛
پست الکترونیک: m.peeri@iauctb.ac.ir
DOI: 10.22077/JPSBS.2019.1818.1455

**مقدمه**

ریه می تواند اندام هدف برای آسیب های سلولی ناشی از آلودگی هوا، دود سیگار، گرد و غبار معدنی، ازن و ... باشد و به طور مستقیم در معرض غلظت بالای اکسیژن قرار دارد (هیدکازو[1] و دیگران، ۲۰۰۶). از سوی دیگر، تولید بیش از حد گونه های اکسیژن واکنش‌پذیر[2] (ROS) تحت شرایط مختلف و با محرک‌هایی مانند سم، آلاینده ها و مصرف بیش از حد مواد مغذی و تمرین می تواند موجب تغییر در تعادل استرس اکسیداتیو و آسیب به زیر ساخت های سلولی مانند اسیدهای نوکلئیک، چربی‌ها و پروتئین شده و در نتیجه، مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس را باعث گردد (سان[3] و دیگران، ۲۰۱۶). نقش بالقوه ROS ها در استرس های زنده و غیرزنده، مانند حمله پاتوژن، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، پیری، سرما، گرما، نور شدید به خوبی نشان داده شده است (ناندا[4] و دیگران ، ۲۰۱۰).

در حال حاضر، مشارکت آپوپتوزیس در انواع مختلف بیماری های ریوی و اهمیت آن در توسعه ساختار و عملکرد طبیعی ریه بسیار مورد توجه قرار گرفته است (هنسون[5] و دیگران، ۲۰۰۸). مرگ برنامه ریزی شده سلولی[6] (PCD) که آپوپتوزیس یکی از نشانه‌های آن است، اجازه می دهد تا سلول های غیرفعال، آسیب دیده و مضر حذف شوند، با این وجود، آپوپتوزیس وقتی که بیش از حد القا شود، می تواند منجر به تغییر غیر طبیعی در ساختار و عملکرد ریه گردد (کوهن[7]، ۱۹۹۷). تنوعی از سیگنال‌های درونی و بیرونی، بیان ژن‌هایی را تنظیم می‌کند که شروع آپوپتوزیس را کنترل می نمایند (گرین[8] و دیگران، ۱۹۹۸). به طور درونی، ژن‌ها پروتئین‌هایی را بیان می‌کنند که یا در شروع آپوپتوزیس نقش دارند، مانند پروتئین X مرتبط با BCL-2[9] (BAX)، گیرنده مرگ[10] (Fas)، آنتی ژن تومور سلولی[11] (P53)؛ و یا آپوپتوزیس را بازداری می‌کنند، مانند لنفوم فولیکولار سلول‌های BCL-2[12] و لنفوم فولیکولار سلول های B بزرگ BCL-XL[13]؛ تغییراتی که پیامد آن ها برای سلول (مرگ در برابر بقاء) به نسبت ژن‌های بیان‌شده بستگی دارد (میگنوتی[14] و دیگران، ۱۹۹۸).

امروزه ویتامین D به سبب نقشی که به عنوان آنتی اکسیدان برای آن متصور شده اند، بسیار مطرح شده است (بارکر[15] دیگران، ۲۰۱۳). ویتامین D نقش مهمی در هومئوستاز بافت های مختلف از جمله عضله اسکلتی، عضله صاف عروق، میوکارد و اندوتلیوم و در کل، کنترل همه عوامل مرگ و میر؛ بر عهده دارد (پولیدورو[16] و دیگران، ۲۰۱۳). از سوی دیگر، اکثر موارد مسمومیت با ویتامین D و بروز هیپرکلیسمی، با دریافت ویتامین D روزانه بیش از ۱۰۰۰ میکرو گرم (۴۰،۰۰۰ IU) و سطح ۲۵ هیدروکسی ویتامین D بیش از ۲۰۰ میکرو گرم همراه بوده است (داوسون[17] و دیگران، ۱۹۹۷). بسیاری از شواهد نشان می دهند که ممکن است غلظت سرمی ویتامین D بر عملکرد ریوی اثر بگذارد و یکی از علل افزایش جریان هوا به درون ریه ها را به وجود ویتامین D نسبت داده اند؛ چرا که موجب افزایش ظرفیت راه های هوایی و تولید پپتیدهای ضد میکروبی می شود (جیند[18] و دیگران، ۲۰۰۹). در دهه های گذشته تحقیقات زیادی بر روی فعالیت ضد سرطانی ویتامین D متمرکز شده است، زیرا مشخص شده که کلسی تریول 2D3 (OH) 1.25 شکل فعال ویتامین D3 - با آزاد کردن آنزیم سیکلواکسیژناز-۱[19] و فعال کردن مسیر پیام‌دهی فاکتور هسته ای کاپا B[20] و بیان ژن DKA_1RNA؛ نقش سرکوب کننده سلول های سرطانی را ایفا می‌کند (اسلومینسکی[21] و دیگران، ۲۰۱۷). ویتامین D از طریق متصل شدن گیرنده ویتامین D[22] (VDR) بر سلول هایی همچون دستگاه گوارش، کلیه، پوست، سیستم ایمنی و ریه که سطح بالایی از VDR را بیان می کنند (جیند و دیگران، ۲۰۰۹)؛ تأثیر می گذارد. نقش شناخته شده ویتامین D تنظیم هموستاز کلسیم است (هولیسک[23]، ۲۰۱۱؛ پیکه[24] و دیگران، ۲۰۰۷). اثرات غیر کلسیمی ویتامین D شامل تنظیم مستقیم و غیرمستقیم چرخه سلولی، تکثیر، تمایز و آپوپتوزیس می باشد. بنابراین جای تعجب نیست که آنالوگ های ویتامین D در پیشگیری و درمان سرطان به کار گرفته می شوند (سرجیو[25]، ۲۰۱۴؛ ترامپ[26] و دیگران، ۲۰۱۰).

1. Hidekazu
2. Reactive oxygen species
3. Sun
4. Nanda
5. Henson
6. Programmed cell death
7. Cohen
8. Green
9. BCL2-associated X protein
10. Apoptosis stimulating fragment
11. Tumor protein p53
12. B-cell lymphoma 2
13. B-cell lymphoma-extra large
14. Mignotte
15. Barker
16. Polidoro
17. Dawson
18. Ginde
19. Cyclo Oxygenase1
20. NF- KB
21. Slominski
22. Vitamin D receptor
23. Holick
24. Pike
25. Sergeev
26. Trump

از سوی دیگر، میزان فعالیت جسمانی با سطوح ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D ارتباط دارد، اما این که چنین ارتباطی بازتابی از تأثیر مستقیم فعالیت بدنی بر متابولیسم ویتامین D است یا نتیجه ای از ارتباط بین فعالیت جسمانی با درصد چربی و یا قرار گرفتن در معرض نور خورشید؛ به خوبی مشخص نشده است (لوکر[1]، ۲۰۰۷). به نظر می رسد انواع تمرین هوازی و بی‌هوازی، توانایی افزایش استرس اکسیداتیو در هر دو مدل انسان و حیوان را دارند که به حالت، مدت و شدت تمرین، و رژیم غذایی بستگی دارد (کلسی[2] و دیگران، ۲۰۰۹). در طی تمرین با شدت کم و طولانی مدت، سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بدن معمولا به اندازه کافی قوی است تا بتواند ROS را پاک کند. به طور کلی، تمرینات شدید و برون‌گرا (اکسنتریک) با فنوتیپ پرو - آپوپتوزیسی[3] و افزایش تخریب DNA (یک نشانه از آپوپتوزیس) همراه است. از سوی دیگر، نتایج پژوهش ها حاکی از اثرات مفید فعالیت ورزشی منظم در کاهش و پیشگیری بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو همانند سرطان، بیماری های قلبی- عروقی، دیابت و ... می باشند. بنابراین به نظر می رسد که اثرات مفید فعالیت ورزشی منظم در کاهش و جلوگیری از بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو، به دلیل تقویت سیستم آنتی اکسیدانی بدن است (آلسیو[4] و دیگران، ۱۹۸۸).

از آنجا که اخیراً مشخص شده است که ویتامین D سبب کاهش عفونت تنفسی، پیشگیری از حملات آسم، مقاومت در برابر استروئیدها، کاهش استئوپروز[5] و کنترل آسم مزمن می شود (جیند و دیگران، ۲۰۰۹) و از سوی دیگر، تولید بیش از حد و تجمع ROS می‌تواند به غشاهای زیستی، پروتئین ها و DNA آسیب برساند و موجب بیماری های ریوی گردد (آمس[6] و دیگران، ۱۹۹۲)؛ برخی محققان علاوه بر استفاده درمانی از تمرین در بیماران مبتلا به بیماری های تنفسی، بر مصرف مکمل ویتامین D به عنوان یک روش درمانی تأکید کرده اند (جیند و دیگران، ۲۰۰۹). لذا با توجه به آثار مطلوب فعالیت منظم هوازی بر روند آپوپتوزیس احتمال دارد که استفاده از مکمل ویتامین D بتواند اثر فعالیت تمرینی منظم را تقویت کند. به دلیل کمبود شواهد و شاید هم نبود مطالعه ای که اثر همزمان فعالیت تمرینی منظم و ویتامین D را بر آسیب اکسیداتیو آپوپتوزیس ریوی بررسی کرده باشد، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر تمرین هوازی و ویتامین D بر بیان ژن های BCL2، BAX، کاسپاز-۳[7] و نسبت BCL-2/BAXدر ریه رت های نر مسموم شده با آب اکسیژنه انجام گرفت.

**روش تحقیق**

در یک کارآزمایی تجربی، ۴۸ سر موش نر (رت) بالغ از نژاد ویستار با وزن ۲۰±۲۲۰ گرم و سن ۱۰-۸ هفته‌ای از مرکز حیوانات دانشگاه شیراز تهیه و به اتاق حیوانات مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انتقال یافتند. جهت تطابق فیزیولوژیک رت ها، دورهٔ ۱۲ ساعتهٔ تاریکی/ روشنایی و کنترل دما در حد ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد رعایت گردید. رت ها آزادانه به آب و غذای ویژه (تهیه شده توسط شرکت غذای دام پارس، تهران، ایران) دسترسی داشتند و به مدت یک هفته قبل از شروع پروتکل، با محیط سازگار شدند. سپس به طور تصادفی به ۶ گروه (۸ تایی) شامل شامل آب اکسیژنه دو برابر (2H)؛ $2H_2O_2$ + ویتامین D3 (2HD)؛ $2H_2O_2$ + تمرین ورزشی منظم (2HE)؛ $2H_2O_2$ + D3 + E (2HDE)؛ دی متیل سولفوکساید[8] (DMSO)، و نهایتا گروه کنترل (C) تقسیم شدند.

**ایجاد مسمومیت با $H_2O_2$:** رت های گروه های 2H، 2HE، 2HD و 2HDE تزریق درون صفاقی $H_2O_2$ را با دوز ۲ میلی مول بر کیلوگرم از وزن بدنشان دریافت کردند؛ به گونه ای که تجویز به صورت ۳ بار در هفته در روزهای زوج انجام شد (لی[9] و دیگران، ۲۰۱۰).

**پروتکل تمرین هوازی:** گروه های تمرینی فعالیت بر روی نوارگردان را به مدت ۸ هفته با تکرار ۵ روز در هفته انجام دادند. برای آشنایی، به مدت ۲ هفته روی نوارگردان با شیب صفر درصد و با سرعت ۱۰ الی ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۱۰ الی ۳۰ دقیقه در هر روز دویدند. سپس به صورت تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه های تمرینی با شدت ۶۰-۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی[10] ($Vo_{2max}$) به مدت ۴۹ دقیقه در مدت یک ساعت با شیب ۱۰ درجه دویدند. جهت سرد کردن همانند گرم کردن به مدت ۵ دقیقه با شدت ۴۰ درصد $Vo_{2max}$ به دویدن ادامه دادند و در طول تمرین نیز سرعت نوارگردان به تدریج طوری افزایش یافت که رت ها به سرحد خستگی (واماندگی) نرسند. شیب نوارگردان ۱۰

1. Looker
2. Kelsey
3. Pro - Apoptotic
4. Alessio
5. Osteoporosis
6. Ames
7. Caspa6e3
8. Dimethyl sulfoxide
9. Li
10. Maximal oxygen consumption

درجه ثابت بود، اما سرعت و مدت تمرین به تدریج افزایش یافت، به گونه ای که از ۸ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفته اول، به ۱۲ متر در دقیقه با زمان مشابه در هفته دوم، ۱۶ متر در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه در هفته سوم، و ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه در هفته چهارم؛ افزایش یافت. طی هفته های پنجم تا هشتم سرعت به میزان ۲۰ متر در دقیقه با مدت ۶۰ دقیقه ثابت ماند (هیوسان و هازلریگ[1]، ۲۰۰۲).

**تزریق ویتامین D:** رت ها ۰/۵ میکروگرم ویتامین D3 به صورت تزریق درون صفاقی (هالدر[2] و دیگران، ۲۰۱۲) به صورت روزانه دریافت کردند. از آمپول ویتامین D3 با نام تجاری DITHRECOL از شرکت کاسپین ویتامین – تهران - ایران با غلظت ۳۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی بر حسب میلی لیتر[3] (UI/ml) استفاده شد. جهت رسیدن به دوز مناسب تزریقی، از نرمال سالین[4] برای رقیق کردن و از DMSO جهت حل کردن ویتامین D3 در سالین استفاده شد.

**روش بیهوشی:** ۲۴ ساعت از آخرین جلسه پروتکل، جهت اجتناب از سهم زیاد تولید ROS درون زا (پلنت[5] و دیگران، ۲۰۰۳) و پس از ۱۲ ساعت گرسنگی، رت ها با استنشاق کلروفورم بیهوش و سپس فدا شدند. ریه ها به دقت جدا و بلافاصله در ازت مایع ۲۰°C- منجمد و برای آزمایشات بعدی در دمای ۷۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**آماده سازی پردازش بافت برای استخراج RNA:** بافت ریه رت‌های قربانی شده بعد از جداسازی و شستشو با محلول PBS، در محلول RNA Later (Ambion, L/N: 1206029) قرار داده شد. این محلول برای تثبیت و محافظت از بافت RNA سلولی مورد استفاده قرار می گیرد. کل RNA از ۳۰ میلی گرم بافت (وزن مرطوب) با استفاده از مینی کیت کیاژن آلمان[6] استخراج شد.

**استخراج RNA و سنتز CDNA:** تبدیل RNA به CDNA با استفاده از مخلوط سریع مخازن RNA با ظرفیت بالا و با استفاده از دستگاه Real Time PCR[7] ساخت آمریکا انجام شد. یک مرحله Real Time PCR برای ارزیابی بیان ژن با استفاده از روش تگمن[8] انجام شد. رونویسی معکوس به cDNA با استفاده از کیت QRT-PCR دو مرحله ای RNA؛ ظرفیت بالا به cDNA و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (جدول۱). Actb و Gapdh به عنوان ژن های مرجع مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). پرایمر TaqMan و پروب برای کاسپاز-۳، BAX، BCL2، Actb و Gapdh از آزمون های پیش طراحی شده از کمپانی اپلاید بیوسیستم آمریکا[9] تهیه شد. تمام آزمایش ها در سه تکرار بیولوژیکی انجام گرفتند.

**برنامه Real-time PCR:** پروتکل تولید شامل ۲ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد ترانزیستور معکوس، ۲۰ ثانیه فعال سازی پلیمراز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، و در مدت ۱ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون[10]، مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای آنیلینگ[11]، برای ۴۰ دوره انجام شد. نرم افزار data Assist v3 از کمپانی اپلاید بیوسیستم آمریکا برای محاسبه تغییرات RNA مورد استفاده قرار گرفت. برنامه Real-time PCR داده ها با توجه به تغییرات تطبیقی روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ بیان تجزیه و تحلیل شد (وانگ و مدرانو، ۲۰۰۵).

**جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه**

| Gene | Primer sequence Product | length (bp) |
|---|---|---|
| Bax | F: ccccgtgagg gccgcacgtc tgcggggagt cacgtgaccg<br>R: mdgsgdhlgg ggptsseqim ktgafllqgf iqdraermag | 63bp |
| Bcl-2 | F:cctcatgaaa taaaaagctg aaaggaattt gaataaaaat<br>R: maqagrtgyd nreivmkyih yklsqrgyew dtgdedsapl | 104bp |
| Casp -3 | F:gggatcaaag cttagtgtcc tgaggtgcgg agcttggaac<br>R: mdnnetsvds ksinnfetkt ihgsksmdsg iyldssykmd | 93 bp |
| Actb | F:gtcgagtccg cgtccacccg cgagtacaac cttcttgcag ctcctccgtc gccggtccac<br>R:mdddiaalvv dngsgmckag fagddaprav fpsivgrprh qgvmvgmgqk dsyvgdeaqs | 91 bp |
| Gapdh | F:ggggctctct gctcctccct gttctagaga cagccgcatc ttcttgtgca gtgccagcct<br>R:mvkvgvngfg rigrlvtraa fscdkvdiva indpfidlny mvymfqydst hgkfngtvka | 174 bp |

1. Husain & Hazelrigg
2. Halder
3. International units per millilitre
4. Normal saline
5. Plant
6. Qiagen, Germany
7. Real-time PCR
8. Tagman gene expression assay
9. Applied biosystems, Foster cuty, CA, USA
10. Denaturation
11. Annealing

**روش های آماری:** از نرم افزار Graph Pad Prism جهت تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد. در ابتدا با استفاده از تحلیل واریانس یک راهه اثر دریافت $H_2O_2$ با حلال و گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند و در صورت مشاهده تفاوت، از آزمون تعقیبی توکی[1] برای پیدا نمودن محل تفاوت ها استفاده شد. به علاوه، با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دو راهه برای گروه های مستقل نیز نتایج به دست آمده مورد تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات $p< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

## یافته ها

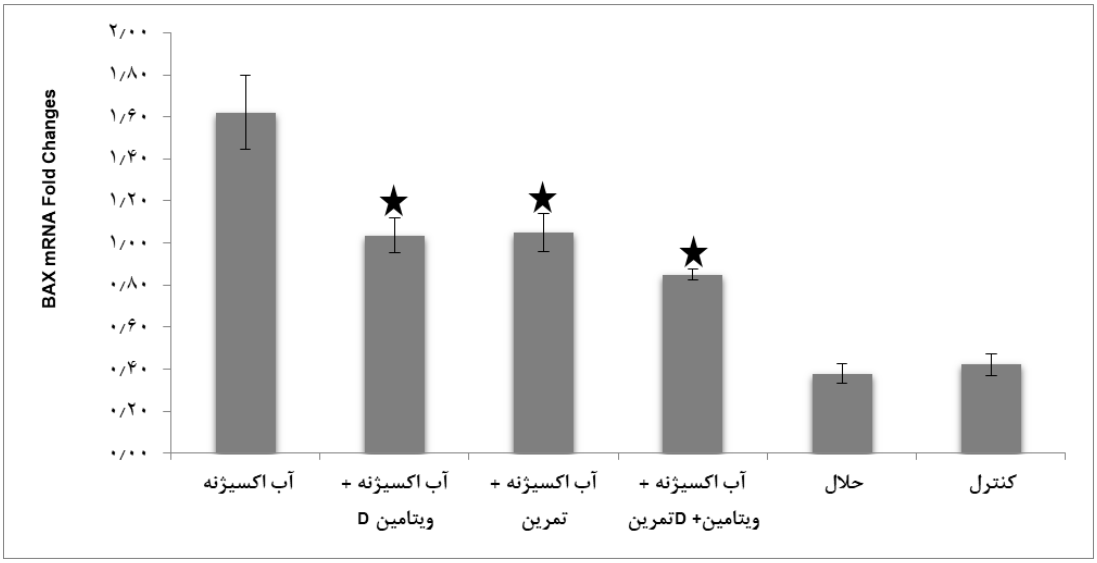
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه جهت تعیین اثر $H_2O_2$ و حلال بر بیان ژن BAX بافت ریه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن BAX (شکل۱) بین گروه ها وجود دارد ($p=۰/۰۰۰۱$). آزمون پیگیری توکی (جدول ۱) نشان داد که بیان ژن BAX درگروه $H_2O_2$ ۲میلی مول/ کیلوگرم به طور معنی‌داری بیشتر از گروه حلال و کنترل است ($p=۰/۰۰۰۱$).

**جدول ۱. نتایج آزمون پیگیری توکی در مورد بیان ژن BAX**

| متغیر | گروه | گروه | میانگین تفاوت ها | خطای انحراف | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|---|
| ژن BAX | آب اکسیژنه ۲ میلی مول/کیلوگرم | حلال | ۱/۲۴ | ۰/۱۰ | ۰/۰۰۰۱* |
| | آب اکسیژنه ۲ میلی مول/کیلوگرم | کنترل | ۱/۲۰ | ۰/۱۰ | ۰/۰۰۰۱* |

*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه ها در سطح p<۰/۰۵.**

نتایج آزمون تحلیل واریانس دو راهه مستقل جهت تعیین اثر تمرین و ویتامین D بر بیان ژن BAX در رت های قرار گرفته در معرض $H_2O_2$ نشان داد ( شکل ۱) که تمرین ($\mu=۰/۷۵$، $p=۰/۰۰۱$، $F=۲۴/۳۸$) و ویتامین D ($\mu=۰/۷۶$، $p=۰/۰۰۱$، $F=۲۶۴/۳۳$) اثر کاهش معنی داری بر بیان ژن BAX دارند. تعامل تمرین و ویتامین D نیز موجب کاهش معنی دار بیان ژن BAX شد ($\mu=۰/۴۴$، $p=۰/۰۳$، $F=۶/۴۰$).




**شکل ۱. مقایسه بیان ژن BAX در گروه های مورد مطالعه.**

*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه ها در سطح p<۰/۰۵.**



1. Tukey

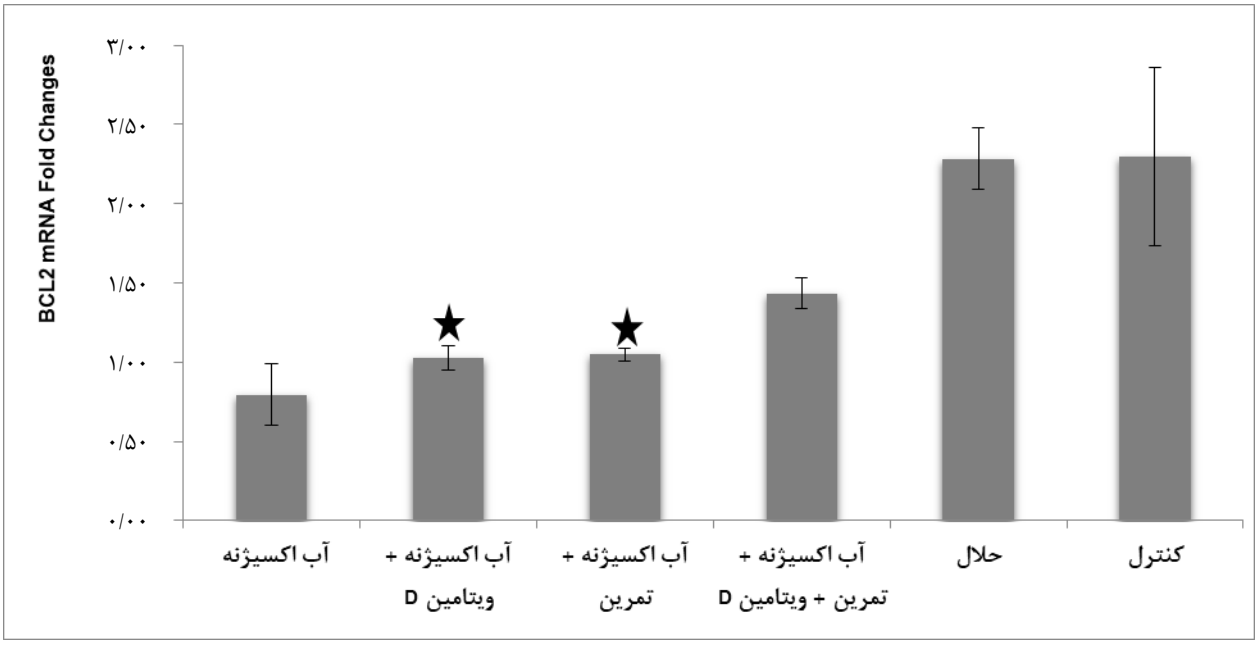
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن BCL-2 بافت ریه (شکل ۲) بین گروه ها وجود دارد (p=۰/۰۰۵). از طریق آزمون پیگیری توکی مشخص شد که بیان ژن BCL-2 در گروه $H_2O_2$ به طور معنی داری کمتر از گروه حلال و کنترل ( p=۰/۰۱) است ( جدول ۲).

**جدول ۲. نتایج آزمون پیگیری توکی در مورد بیان ژن BCL-2**

| متغیر | گروه | گروه | میانگین تفاوت ها | خطای انحراف | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|---|
| ژن BCL-2 | آب اکسیژنه ۲ میلی مول/گیلوگرم | حلال | -۱/۴۸ | ۰/۳۵ | ۰/۰۱* |
| | آب اکسیژنه ۲ میلی مول/گیلوگرم | کنترل | -۱/۵۰ | ۰/۳۵ | ۰/۰۱* |

*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه ها در سطح p<۰/۰۵.**

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دو راهه نیز مشخص شد که تمرین به تنهایی افزایش معنی داری بر بیان ژن BCL-2 دارد (μ=۰/۶۶، p = ۰/۰۰۴، F=۱۶/۰۲). ویتامین D نیز افزایش معنی داری بر بیان ژن BCL-2 داشت (μ=۰/۶۳، p=۰/۰۰۶، F=۱۴)؛ در حالی که تعامل تمرین و ویتامین D اثر معنی داری بر بیان ژن BCL-2 نداشت (μ=۰/۰۹، p=۰/۳۷، F=۸۶۹) .




**شکل ۲. مقایسه بیان ژن BCL2 در گروه های مورد مطالعه.**
*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه ها در سطح p<۰/۰۵.**

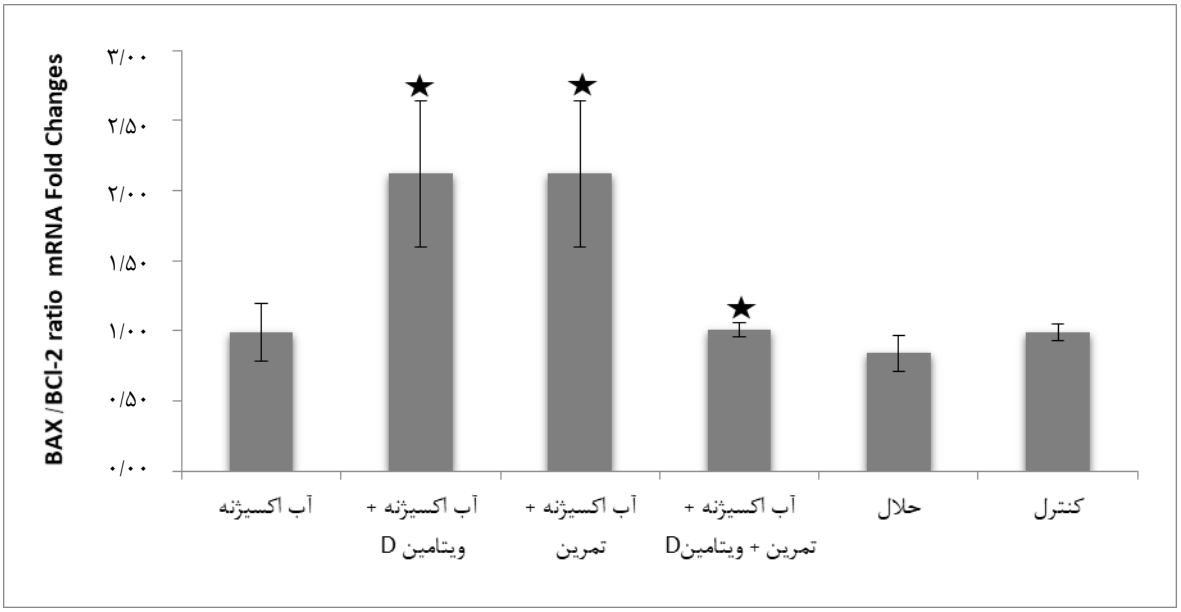
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه تفاوت معنی‌داری در نسبت بیان ژن BCL2/BAX بافت ریه (شکل ۳) را نشان داد (p=۰/۰۰۰۱). با استفاده از نتایج آزمون پیگیری توکی نشان داده شد که نسبت BCL2/BAX در گروه حلال (۰/۰۰۰۱) به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل (p=۰/۰۰۶) است (جدول ۳).

**جدول ۳. نتایج آزمون پیگیری توکی در مورد نسبت بیان ژن BCL2/BAX**

| متغیر | گروه | گروه | میانگین تفاوت ها | خطای انحراف | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|---|
| نسبت بیان ژن BCL2/BAX | آب اکسیژنه ۲ میلی مول/گیلوگرم | حلال | -۱/۵۳ | ۰/۲۳ | ۰/۰۰۰۱* |
| | آب اکسیژنه ۲ میلی مول/گیلوگرم | کنترل | ۱/۱۳ | ۰/۶۳ | ۰/۰۰۶* |

*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه ها در سطح p<۰/۰۵.**

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دو راهه نیز مشخص گردید که تمرین (F=۲۵/۳۲ ،p=۰/۰۰۱ ،μ=۰/۷۶) و ویتامین D (F=۲۴/۵۱ ،p=۰/۰۰۱ ،μ=۰/۷۵) و نیز تعامل این دو (F=۵/۴۲ ،p=۰/۰۴ ،μ=۰/۴۰)؛ اثر کاهش معنی داری در نسبت بیان ژن BCL2/BAX دارند.




**شکل ۳. مقایسه نسبت بیان ژن BCL2/BAX در گروه های مورد مطالعه.**

*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵.**

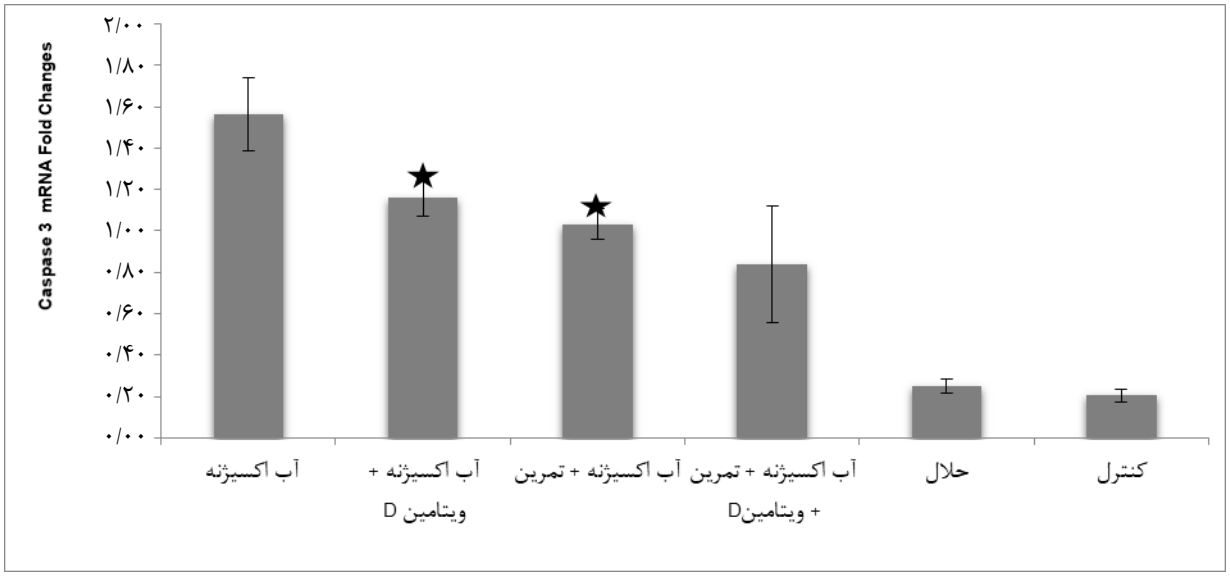
نتایج تحلیل یک راهه واریانس جهت تعیین اثر $H_2O_2$ و حلال بر بیان ژن کاسپاز-۳ بافت ریه (شکل ۴) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن بین گروه‌ها وجود دارد (p=۰/۰۰۰۱). نتایج آزمون پیگیری توکی نشان داد که بیان ژن کاسپاز-۳ در گروه $H_2O_2$ به طور معنی داری بیشتر از گروه حلال و کنترل (p=۰/۰۰۰۱) است (جدول ۴).

**جدول ۴. نتایج آزمون پیگیری توکی بر نسبت بیان ژن کاسپاز-۳**

| متغیر | گروه | گروه | میانگین تفاوت ها | خطای انحراف | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|---|
| بیان ژن کاسپاز-۳ | آب اکسیژنه ۲میلی مول/گیلوگرم | حلال | ۱/۳۱ | ۰/۰۹ | ۰/۰۰۰۱* |
| | آب اکسیژنه ۲میلی مول/گیلوگرم | کنترل | ۱/۳۵ | ۰/۰۹ | ۰/۰۰۰۱* |

*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه ها در سطح p<۰/۰۵.**

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دو راهه همچنین مشخص گردید که تمرین کاهش معنی‌داری بر بیان ژن کاسپاز-۳ دارد (F=۱۱/۶۸ ،p=۰/۰۰۹ ،μ=۰/۵۹). ویتامین D نیز کاهش معنی داری بر بیان ژن کاسپاز-۳ داشت (F=۵/۷ ،p=۰/۰۴ ،μ=۰/۴۱)؛ اما تعامل تمرین و ویتامین D تغییر معنی داری در بیان این ژن ایجاد نکرد (F=۰/۶۸ ،p=۰/۴۳ ،μ=۰/۰۷).




**شکل ۴. مقایسه بیان ژن کاسپاز-۳ در گروه های مورد مطالعه.**

*** نشانه تفاوت معنی دار بین گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵.**

**بحث**

مطالعه حاضر از نخستین مطالعاتی است که به اثر همزمان تمرین منظم هوازی با مکمل ویتامینD در شرایط مسمومیت شدید با $H_2O_2$ بر بیان ژن های آپوپتوزی BAX، BCL2 و کاسپاز-۳ و نسبت BCL2/BAX در بافت ریه پرداخته است. به عبارت دیگر، بافت های مورد استفاده در مطالعات اغلب بافت قلب و عضلات اسکلتی و یا سطح سرمی بوده است و کمتر گزارشی در مورد بافت ریه در منابع وجود دارد. نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر دال بر آن است که تمرین و ویتامین D به تنهایی و در ترکیب با هم، موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن BAX می شوند. تمرین هوازی منظم احتمالاً از یک سوی با القای آنزیم های آنتی اکسیدانی سبب کاهش رادیکال های آزاد می شود و از سوی دیگر، با بهبود عملکرد میتوکندری ها، کاهش بیان ژن BAX و مهار آپوپتوزیس را در پی دارد (مدیر[1] و دیگران، ۲۰۱۴).

تمرینات ورزشی باعث افزایش مقاومت عضلات تنفسی و به دنبال آن، بهبود تهویه و افزایش حداکثر جریان بازدمی می شود (وینر[2] و دیگران، ۲۰۰۰)، از این رو، در راستای ارزیابی اثر حفاظتی تمرین، نتایج تحقیق ما با یافته های فرناندز[3] و دیگران (۲۰۱۲) مبنی بر افزایش BCL2 و کاهش BAX و در کل مهار آپوپتوزیس، به دنبال ۱۰ هفته تمرین شنا در موش ها همخوانی دارد. با این حال نشان داده شده که پس از تمرین هوازی بیان ژن BCL2 کاهش و بیان ژن BAX افزایش می یابد (فانوف[4] و دیگران، ۲۰۰۱). علت این ناهمسویی در یافته ها را شاید بتوان به طول دوره تمرین (هفته های تمرین) نسبت داد. شدت تمرین هم ممکن است در تحریک سیستم ایمنی در جریان بیمای های خاص (مثل سرطان و ایدز)، اختلال عملکرد و یا کاهش پاسخ ایمنی نقش داشته باشد (آلون[5] و دیگران، ۲۰۰۹). التهاب ریوی ناشی از مسمومیت شدید با $H_2O_2$، مشابه آنچه در مطالعه حاضر انجام شد؛ ممکن است باعث تجمع سلول های التهابی در فضای آلوئولی و بافت‌های بینابینی شده و با افزایش سلول های التهابی در فضاهای هوایی و بافت بینابینی و به دنبال آن، آزاد کردن عوامل سمی مختلف همانند پروتئازها و رادیکال های آزاد در نقاط التهاب؛ آسیب سلول‌های پارانشیم را موجب شده و متعاقباً مرگ سلولی را در پی داشته باشد (آلون و دیگران، ۲۰۰۹). با توجه به ارتباط معنی‌داری که بین عملکرد ریوی با سطح سرمی ویتامینD وجود دارد (کالورلی[6] و دیگران، ۲۰۰۷)، احتمالاً ویتامین D با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و از طریق مکانیسم های مختلف، می تواند اثر محافظتی در برابر استرس القاء شده داشته باشد؛ روندی که در تحقیق حاضر (با مداخله تمرین و ویتامین D) نیز رخ داد و موجب کاهش بیان ژن BAX شد.

نتایج مطالعه حاضر در خصوص BCL2 نشان داد که تمرین و ویتامین D هر کدام به تنهایی باعث افزایش معنی‌داری در بیان ژن BCL2 می شوند؛ در حالی که تعامل تمرین و ویتامین D اثر معنی‌داری بر بیان این ژن نداشت. مطالعات نشان داده اند که افزایش BCL2 به عنوان یک آنتی اکسیدان، موجب تحکیم دیواره میتوکندری شده و با سرکوب BAX، از رهاسازی سیتوکروم C جلوگیری کرده و با تنظیم کلسیم و کاهش اثر ROS، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و ایمنی سلول را بالا می‌برد و از آپوپتوزیس ناشی از استرس جلوگیری می کند (کوادریالترئو[7] و دیگران، ۲۰۱۱). افزایش شدت و مدت تمرین ورزشی علاوه بر ایجاد چالش در هموستاز و سایر آسیب های ناشی از بیش تمرینی، استرس وارده بر دستگاه تنفسی بدن را بالا برده و می‌تواند میزان اکسیژن رسانی را تحت تاثیر قرار دهد. در این زمینه، تعدادی از محققان عنوان کرده اند که انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط، احتمالاً موجب کاهش آپوپتوزیس در بافت‌های مختلف می‌شود (مک میلان[8] و دیگران، ۲۰۱۱). با انجام ورزش های هوازی، تحمل عضلات تنفسی افزایش یافته و با اتساع قفسه سینه، حجم های ریوی بهبود پیدا می کند (هازل و کلارکسون[9]، ۲۰۰۰). از طرف دیگر، تمرین تناوبی شدید، با افزایش رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو ناشی از آن، به ساختار DNA آسیب زده و در بسیاری از ارگان‌ها از جمله ریه، منجر به بروز آپوپتوزیس می‌شود (پودهورسکا[10] و دیگران، ۲۰۰۶). این در حالی است که بر خلاف فعالیت های ورزشی شدید، انجام فعالیت‌های ورزشی با شدت متوسط و مداوم، احتمالا

1. Modir
2. Weiner
3. Fernandes
4. Phaneuf
5. Allon
6. Calverley
7. Quadrilatero
8. McMillan
9. Hazel & Clarkson
10. Podhorska

با کاهش آپوپتوزیس در بافت ها ی مختلف همراه هستند (مک میلان و دیگران، ۲۰۱۱). بهبود تناسب قلبی- عروقی از طریق ورزش هایی نظیر راه رفتن و دوچرخه سواری به منظور تقویت ظرفیت ایجاد می شود (هازل و کلارکسون، ۲۰۰۰). از این رو، شاید بتوان علت ناهمسویی در تحقیقات مختلف را به تفاوت در الگوها و روش‌های مختلف تمرینی نسبت داد.

علاوه بر این ها، در مطالعه حاضر تمرین و ویتامین D موجب کاهش معنی‌دار نسبت BCL2/BAX شدند. در این راستا مطالعات نشان داده اند که نسبت BCL2/BAX شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوزیس میتوکندریایی است؛ به گونه ای که BCL2 با جلوگیری از جابجایی و انتقال BAX به میتوکندری ها، با فعالیت پیش آپوپتوتیک آن مخالفت می کند. (کوک تارک[1] و دیگران، ۲۰۰۸). در مطالعه ای نشان داده شد که کاهش نسبت BCL2/BAX در اثر تمرینات ورزشی، می تواند آپوپتوزیس را کاهش دهد؛ روندی که ظاهراً با به حداقل رساندن نفوذپذیری میتوکندری ها رخ می دهد (کوک تارک و دیگران، ۲۰۰۸). علاوه بر این، در پرتو مطالعات مشخص گردیده که ROS آپوپتوزیس را به طور عمده از طریق تعدیل مسیر مربوط به میتوکندری، تحت تأثیر قرار می دهد (کالیانی[2] و دیگران، ۲۰۱۴). از سوی دیگر، گزارش شده که کلسی تریول[3] موجب کاهش آپوپتوزیس و بازسازی سریع اپیتلیال راه هوایی در موش های مبتلا به آسم مزمن می شود؛ تغییراتی که عمدتاً از طریق تنظیم پروتئین BCL2 در مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس توسط کلسی تریول به انجام می رسد (جونگ‌ها[4]، ۲۰۱۵).

زمانی که لیپوفیبروبلاست‌های[5] بینابینی ریه و سلول‌های نوع II آلوئولار (AT II) به مدت ۲۴ ساعت تحت درمان هورمون استرویید 1.25(OH) 2D3 و متابولیت آن 3-epi 1.25(OH) 2D3 قرار گرفتند، تکثیر و تمایز سلولی آن‌ها افزایش یافت و در عوض، آپوپتوزیس کاهش پیدا کرد (ساکورایی[6] و دیگران، ۲۰۰۹). محققین افزایش مشاهده شده در نسبت BCL2/BAX را به عنوان شاخص کاهش خود به خودی آپوپتوزیس لیپوفیبروبلاست‌های بینابینی ریه و AT II عنوان کرده‌اند (ساکورایی و دیگران، ۲۰۰۹).

اعتقاد بر آن است که تمرینات ورزشی از یک سو با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و تعدیل استرس اکسداتیو، موجب کاهش ژن های پیش آپوپتوزی از جمله BAX می شوند (کالیانی و دیگران، ۲۰۱۴)؛ و از سوی دیگر، ویتامین D به واسطه وجود گیرنده هایش (VDR) در بافت ریه، در کاهش آپوپتوزی نقش داشته و تمرینات ورزشی از نقش آنتی اکسیدانی ویتامین D به خوبی حمایت می کنند (ساکورایی و دیگران، ۲۰۰۹). از این رو می توان گفت تمرین منظم همراه با مکمل ویتامین D؛ مکانیسم های تعدیل کننده رادیکال های آزاد را تقویت کرده و موجب بهبود تخریب سلولی القا شده در اثر تمرین می شوند.

در مطالعه حاضر، تمرین بیان ژن کاسپاز-۳ را کاهش داد و این مسئله می تواند تایید دیگری بر نقش حمایتی فعالیت ورزشی از طریق کاهش روند آپوپتوزیس در بافت های بدن باشد. با توجه به این نکته که سلول های طبیعی ممانعت کننده های خاصی را علیه کاسپازها به کار می گیرند، این کاهش نشان دهنده آن است که در شرایط استرس اکسیداتیو، تمرین منظم هوازی می تواند یک راهکار محافظتی برای القای آپوپتوزیس در ریه باشد. مکانیسم های متعددی برای این واکنش محافظتی پیشنهاد شده است که از آن جمله می توان به افزایش بیوژنز میتوکندریایی، کاهش تولید ROS و افزایش سطح آنتی اکسیدانی اشاره کرد (کوادریالترئو و دیگران، ۲۰۰۱). از سوی دیگر، مطالعه حاضر نشان داد که تعامل تمرین با مصرف ویتامین D بر بیان کاسپاز-۳ اثر معنی‌داری ندارد. در این راستا بسیاری از مطالعات کنترل شده نیز مزایایی را به دست نیاورده و نشان داده اند که مکمل‌های آنتی اکسیدانی فقط زمانی می توانند عملکرد را بهبود ببخشند که سطوح درون زای آن ها در حال تخلیه شدن باشد؛ این در حالی است که پس از رسیدن به غلظت طبیعی، هیچ مزیت دیگری برای آنان گزارش نشده است (کرن[7] و دیگران، ۱۹۸۰).

**نتیجه گیری:** تمرین منظم هوازی همراه با مکمل دهی ویتامین D در رت‌های نر در شرایط مسمومیت شدید با $H_2O_2$ نسبت به استفاده از هریک از این استراتژی ها به تنهایی، می توانند

1. Koçtürk
2. Kalyani
3. Calcitriol
4. Zhonghua
5. Lipofibroblasts
6. Sakurai
7. Keren

به عنوان یک روش درمانی مکمل در شرایط آپوپتوزیس ریه به کار گرفته شوند. نتایج مطالعه حیوانی حاضر شاید بتواند راه گشای مطالعات انسانی بعدی در این زمینه باشد؛ اما به مطالعه‌های بیشتر با بررسی سایر عوامل نقش آفرین در روند آپوپتوزیس هم چنان به نظر ضروری می رسد.

**قدردانی و تشکر**

این مقاله بخشی از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی است که در گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به تصویب رسیده است. این مطالعه دارای تاییدیه کمیته اخلاق با کد IR.KMU.REC.1396.1562 از وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان (معاونت تحقیقات و فناوری) می باشد. از گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که در اجرای این مطالعه کمال همکاری را با نویسندگان این مطالعه داشتند؛ تقدیر و تشکر می شود.

## منابع

**Alessio, H. M., & Goldfarb, A. H. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training**. *Journal Applied Physiology, 64(4),**1333-1336***.

**Allon, N., Amir, A., Manisterski, E., Rabinovitz, I., Dachir, S., & Kadar, T. (2009). Inhalation exposure to sulfur mustard in the guinea pig model.clinical, biochemical and histopathological characterization of respiratory injuries.** *Toxicology and Applied Pharmacology, 241***(2), 154-62.**

**Ames, B. N., & Shigenaga, M. K. (1992). Oxidants are a major contributor to aging.** *Annals of the New York Academy of Sciences, 663*, **85–96.**

**Barker, T., Martins, T. B., Hill, H. R., Kjeldsberg, C. R., Dixon, B. M., Schneider, E. D., ... & Weaver, L. K. (2013). Circulating pro-inflammatory cytokines are elevated and peak power output correlates with 25-hydroxyvitamin D in vitamin D insufficient adults.** *European Journal of Applied Physiology, 113***(6), 1523-1534.**

**Calverley, P. M., Anderson, J. A., Celli, B., Ferguson, G. T., Jenkins, C., Jones, P. W., ... & Vestbo, J. (2007). Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease.** *New England Journal of Medicine, 356* **(8), 775-789.**

**Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochemistry Journal*, *326***(1), 1-16.**

**Dawson-Hughes, B., Harris, S. S., Krall, E. A., & Dallal, G. E. (1997). Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older**. *The New England Journal of Medicine*, *337***(10), 670-6.**

**Fernandes, T., Magalhães, F. D. C., Carmo, E. C. D., & Oliveira, E. M. D. (2012). Aerobic exercise training inhibits skeletal muscular apoptotic signaling mediated by VEGF-VEGR2 in spontaneously hypertesive rats.** *Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 18***(6), 412-418.**

***Fisher-Wellman, K.*, & *Bloomer,* R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history.** *Dynamic Medicine, 8***(1), 1-25.**

**Fuchs-Tarlovsky, V. (2012). Role of antioxidants in cancer therapy.** *Nutrition, 29***(1), 15–21.**

**Ginde, A. A., Mansbach, J. M., & Camargo, C. A. (2009). Vitamin D respiratory infection and asthma.** *Current Allergy and Asthma Reports, 9***(1), 81-87.**

**Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and Apoptosis.** *Science, 281*, **1309 –1312.**

**Halder, S. K., Sharan, C., & Al-Hendy, A. (2012). 1, 25-dihydroxyvitamin D3 treatment shrinks uterine leiomyoma tumors in the Eker rat model.** *Biology of Reproduction, 86***(4), 1-10.**

**Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999).** *Free radicals in biology and medicine***, 3th Edition. Oxford University Press, Oxford, 1–35.**

**Hatao, H., Oh-ishi, S., Itoh, M., Leeuwenburgh, C., Ohno, H., Ookawara, T., ... & Matsuoka, T. (2006). Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats.** *Mechanisms of Ageing and Development, 127***(4), 384-390.**

**Hazel, M., & Clarkson, M. A. (2000).** *Musculoskeletal assessment: joint range of motion and manual muscle strength.* **2th Edition. Lippincott: Williams & Wilkins. 76.**

**Henson, P. M., & Tuder, R. M. (2008). Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection.** *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 294***(4), 601–611.**

**Holick, M. F. (2011). Vitamin D: a d-lightful solution for health.** *Journal of Investigative Medicine, 59***(6), 872–880.**

**Husain, K., & Hazelrigg, S. R. (2002). Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1587***(1), 75-82.**

**Kalyani, R. R., Corriere, M., & Ferrucci, L. (2014). Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases.** *The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2***(10), 819-829.**

**Keren, G., & Epstein, Y. (1980). The effect of high dosage vitamin C intake on aerobic and anaerobic capacity.** *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness, 20***(2),145–148.**

**Koçtürk, S., Kayatekin, B. M., Resmi, H., Açıkgöz, O., Kaynak, C., & Özer, E. (2008). The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats.** *European Journal of Applied Physiology, 102***(5), 515-524.**

**Li, S. F., Liu, H. X., Zhang, Y. B., Yan, Y. C., & Li ,Y. P. (2010). The protective effects of alpha-ketoacids against oxidative stress on rat spermatozoa in vitro.** *Asian Journal of Andrology*, *12***(2), 247-256.**

**Lohar, D. P., Haridas, S., Gantt, J. S., & VandenBosch, K. A. (2007). A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis.** *New Phytologist, 173***(1), 39-49.**

**Looker, A. C. (2007). Do body fat and exercise modulate vitamin D status?.** *Nutrition Reviews*, 65**(8), 124-6.**

**Ma, Y., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2010). Vitamin D in combination cancer treatment.** *Journal Cancer, 1*, **101–107.**

**Magi, B., Bargagli, E., Bini, L., & Rottoli, P. (2006). Proteome analysis of bronchoalveolar lavage in lung diseases.** *Proteomics and System Biology, 6***(23), 6354-69.**

**McMillan, E. M., Graham, D. A., Rush, J. W., & Quadrilatero, J. (2012). Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training.** *Journal of Applied Physiology, 113***(7), 1048-1057.**

**Mignotte, B., & Vayssiere, J. L. (1998). Mitochondria and apoptosis**. *European Journal of Biochemistry, 252***(1), 1-15.**

**Modir, M., Daryanoosh, F., Firouzmand, H., Jaffari, H., & Khanzade, M. (2014). Effect of short and medium periods of high intensities aerobic training on serum level of superoxide dismutase and Catalase enzymes in rats.** *Journal of Gorgan University of Medical Sciences, 16***(3), 24-30. [Persian]**

**Nanda, A. K., Andrio, E., Marin, D., Pauly, N., & Dunand, C. (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions.** *Journal of Integrative Plant Biology, 52***(2), 195-204.**

**Phaneuf, S., & Leewenburgh, C. (2001). Apoptosis and exercise.** *Medicine & Science in Sports & Exercice, 33***(3), 393-6.**

**Pike, J. W., Zella, L. A., Meyer, M. B., Fretz, J. A., & Kim, S. (2007). Molecular actions of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis.** *Journal of Bone and Mineral Research, 22***(2), 16–19.**

**Plant, D. R., Gregorevic, P., Warmington, S. A., Williams, D. A., & Lynch, G. S. (2003). Endurance training adaptations modulate the redox–force relationship of rat isolated slow-twitch skeletal muscles.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 30***(1-2), 77-81.**

**Podhorska-Okolow, M., Dziegiel, P., Gomulkiewicz, A., Kisiela, D., Dolinska-Krajewska, B., Jethon, Z., … & Zabel, M. (2006). Exercise-induced apoptosis in rat kidney is mediated by both angiotensin II AT1 and AT2 receptors.** *Journal of Histology & Histopathology: Cellular and Molecular Biology, 21***(5), 459-66.**

**Polidoro, L., Properzi, G., Marampon, F., Gravina, G. L., Festuccia, C., Di Cesare, E., ... & Ferri, C. L. A. U. D. I. O. (2013). Vitamin D protects human endothelial cells from H 2 O 2 oxidant injury through the Mek/Erk-Sirt1 axis activation.** *Journal of Cardiovascular Translational Research, 6***(2), 221-231.**

**Quadrilatero, J., Alway, S. E., & Dupont-Versteegden, E. E. (2011). Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection.** *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 36***(5), 608-617.**

**Quadrilatero, J., Always, S. E., & Dupont-Versteegden, E. E. (2011). Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection.** *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, 36***(5), 608-17.**

**Sakurai, R., Shin, E., Fonseca, S., Sakurai, T., Litonjua, A. A., Weiss, S. T., ... & Rehan, V. K. (2009). 1α, 25 (OH) 2D3 and its 3-epimer promote rat lung alveolar epithelial-mesenchymal interactions and inhibit lipofibroblast apoptosis.** *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 297***(3), L496-L505.**

**Sergeev, I. N. (2014). Vitamin D-mediated apoptosis in cancer and obesity.** *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation, 20***(2), 43–49.**

**Sies, H., & Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks Oxidative Stress**. *New York Academic Journal, 5,* **1–7.**

**Simon-Schnass, I., & Pabst, H. (1988). Influence of vitamin E on physical performance.** *International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 58***(1), 49–54.**

**Slominski, A. T., Brożyna, A. A., Zmijewski, M. A., Jóźwicki, W., Jetten, A. M., Mason, R. S., ... & Elmets, C. A. (2017). Vitamin D signaling and melanoma: role of vitamin D and its receptors in melanoma progression and management.** *Laboratory Investigation, 97***(6), 706-724.**

**Sun, Y., Cui, D., Zhang, Z., Zhang, T., Shi, J., Jin, H., ... & Ding, S. (2016). Attenuated oxidative stress following acute exhaustive swimming exercise was accompanied with modified gene expression profiles of apoptosis in the skeletal muscle of mice.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016***, 1-8.**

**Weiner, P., Berar-Yanay, N., Davidovich, A., Magadle, R., & Weiner, M. (2000). Specific inspiratory muscle training in patients with mild asthma with high consumption of inhaled β2-Agonists agonists.** *Chest, 117***(3), 722-727.**

**Wong, M. L., & Medrana, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation.** *Bio Techniques, 39***(1), 75-85.**

**Zhang, L., Lin, J., Guo, J., Sun W., & Pan, L. (2013). Effects of 1, 25-(OH)2D3 on airway remodeling and airway epithelial cell apoptosis in a murine model of asthma***, Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 95***(48), 3945-9.**