

# اثر هشت هفته تمرين هوائي و مكمل ويتمين دي بر بيان زن استئوكليسين و آلكالين فسفاتاز موش هاي نر مسموم شده با پراكسياد هيدروزن

رامين ايمري اسكندرى<sup>۱</sup>، حسن متين همايى<sup>\*</sup>، ليدا مرادي<sup>۲</sup>

## مقاله پژوهشى

**مقدمه:** راديکال های آزاد در زمان پیری و بیماری افزایش می یابند، لذا هدف این پژوهش بررسی اثر تمرين و ويتمين دی بر بيان زن استئوكليسين و آلكالين فسفاتاز بافت استخوان موش های مسموم شده با پراكسياد هيدروزن بود.

**روش بررسی:** در اين کارآزمایي تجربی ۳۶ سر موش صحرایي نر بالغ نژاد ويستار به طور تصادفي به شش گروه شش سرى ۱) کنترل؛ ۲) پراكسياد هيدروزن؛ ۳) پراكسياد هيدروزن + ويتمين دی؛ ۴) پراكسياد هيدروزن + تمرين؛ ۵) پراكسياد هيدروزن + تمرين و ويتمين دی و ۶) شم تقسيم شدند. در مدت هشت هفته گروه های ۲، ۳، ۴ و ۵ روزانه پراكسياد هيدروزن با دوز يك mmol/kg را در روزهای زوج، گروه های ۳ و ۵ روزانه ۵/۰ gram/kgm ويتمين دی و گروه شم حلال ويتمين دی را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند. گروه های ۴ و ۵ سه جلسه در هفته تمرينات هوائي انجام دادند. بيان زن استئوكليسين و آلكالين فسفاتاز به روش PCR اندازه گيرى و با استفاده از آرمون های t مستقل و آناليز واريанс دو طرفه با آزمون تعقيبى بنفروني و نرم افزار SPSS version 16 تحليل شدند ( $p \leq 0.05$ ).

**نتایج:** اثر تعاملی تمرين و ويتمين دی بر افزایش آلكالين فسفاتاز و استئوكليسين معنادار بود ( $p \leq 0.05$ )؛ تمرين سبب افزایش آلكالين فسفاتاز و استئوكليسين شد ( $p \leq 0.05$ )؛ ويتمين دی نيز با افزایش آلكالين فسفاتاز و استئوكليسين همراه بود ( $p = 0.001$ ). بيشترین اثر بر افزایش آلكالين فسفاتاز و استئوكليسين به ترتيب در گروه ۵ و ۳ مشاهده شد ( $p = 0.001$ ).

**نتيجه گيري:** تمرين و ويتمين دی تاثير مثبتی بر بافت استخوان داشتند، به گونه اى كه حتى اثر سيستمي پراكسياد هيدروزن نيز نتوانست نتایج اين اثر سازنده را تغيير دهد.

**واژه های کلیدی:** آلكالين فسفاتاز، استئوكليسين، پراكسياد هيدروزن، تمرين هوائي، ويتمين دی

**ارجاع:** ايمري اسكندرى رامين، متين همايى حسن، مرادي ليدا. اثر هشت هفته تمرين هوائي و مكمل ويتمين دی بر بيان زن استئوكليسين و آلكالين فسفاتاز موش هاي نر مسموم شده با پراكسياد هيدروزن. مجله علمي پژوهشى دانشگاه علوم پزشکي شهيد صدوقى يزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۷): ۴۲-۴۲. ۳۹۳۱

۱- گروه فيزيولوژي ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ايران.

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، اiran.

\*نويسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۳۶۸۰۸۱۰، پست الكترونيكي: hasanmatinhomaee@gmail.com، صندوق پستي: ۱۹۵۵۸۴۷۸۸۱

## مقدمه

حاوی پروتئین استخوان (Bone Gamma-Carboxyglutamic Acid-Containing Protein) شناخته شده است و فراوان ترین پروتئین غیر کلازنی ماتریکس استخوان می باشد. همانگونه که اشاره شد، ژن استئوکلسین در طی تکثیر استئوبلاست ها غیرفعال است در حالی که تا ۲۰۰ برابر در طی افتراق استئوبلاست ها و بلوغ آن ها رونویسی می شود (۴). همچنان استئوبلاست ها منشاء عظیمی از آلکالین فسفاتاز هستند، از این رو افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و همچنان سطوح سرمی آن نشانه ای از تحريك سلول های استئوبلاست بوده و در نتیجه سیگنالینگ سلولی را در راستای افزایش تراکم موادمعدنی استخوان افزایش می دهد. ژن آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در سوخت و ساز فعال و تامین فسفات غیرآلی آزاد با هیدرولیز اجزای فسفو بر عهده دارد. گزارش شده است که تغییر در ژن آلکالین فسفاتاز ممکن است تعیین کننده مهمی در کاهش استخوان ناشی از سن باشد و مسیر سوخت و ساز فسفات به عنوان یک هدف جدید در پیشگیری از پوکی استخوان محسوب شود (۵). تغییر در بیان ژن های یاد شده تحت تاثیر تحريکات مکانیکی می باشد و پژوهش های انجام شده در این خصوص نشان می دهند که تمرين به اشكال مختلف هوازی بر افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین اثرات مطلوبی دارد (۶-۹). علاوه بر فعالیت بدنی محققین استفاده از برخی مکمل ها جهت بهبود وضعیت توده معدنی استخوان را به افراد توصیه می کنند. از جمله این مکمل ها ویتامین دی می باشد که جذب و معدنی سازی ماتریکس استخوان را افزایش می دهد. از لحاظ بیولوژیکی، مکمل های کلسیم و ویتامین دی باعث کاهش سرعت تخریب توده استخوانی و خطر شکستگی می شوند (۱۰). همچنان پژوهش ها نشان می دهد که مکمل یاری ویتامین دی تشکیل استخوان و مارکرهای استئوژنیک *invitro* و *OC* را افزایش می دهد (۳). اثرات مخبر *ALP* بر استئوبلاست ها زمانی رخ می دهد که تکثیر رخ دهد و مراحل مختلف افتراق استئوبلاست ها به وسیله بیان ژن های خاص مشخص می شود. افتراق اولیه به وسیله بیان سطوح بالای آنزیم آلکالین فسفاتاز (*ALP*) و افتراق های بعدی به وسیله بیان استئوکلسین (*OC*) و استئوپوئتین مشخص می شود (۳). استئوکلسین به عنوان اسید گاما کربوکسی گلوتامیک اسید

پوکی استخوان یک بیماری متابولیک استخوان است که با کاهش قدرت استخوان و افزایش خطر شکنندگی و شکستگی استخوان همراه است. شواهدی وجود دارد که بیان می دارد استرس اکسیداتیو با پوکی استخوان همراه است. همچنان ارتباط بیوشیمیابی بین افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش توده معدنی استخوان (BMD) در مردان و زنان وجود دارد (۱). تولید گونه های فعال اکسیژن یک نتیجه غیر قابل تغییر متابولیسم هوازی است که در ابتدا در میتوکندری اتفاق می افتد. این فرآیند سوپراکساید را که بسیار فعال است و عمر کوتاهی دارد، تولید می کند. سوپراکساید به سرعت به شکل پایدارتر و کم فعال تر پراکساید هیدروژن ( $H_2O_2$  یا آب اکسیژن) تبدیل می شود که بیشترین شکل گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species-ROS) است که به آزادی از غشاء میتوکندری به درون سیتوزول عبور می کند (۲). این ROS ها می توانند سبب آسیب به DNA، پروتئین و چربی شوند. سطوح بالای تولید اکسیدان ها در طی متابولیسم طبیعی سلول (چرخه انتقال الکترون)، تحريکات محیطی (نظری سایتوکاین ها یا اشعه ماوراء بنفش) و در زمان بیماری ها، تعادل نرمال ردوكس را برهم می زند و سلول ها را به سمت وضعیت استرس اکسیداتیو هدایت می کنند (۱). استخوان اما یک بافت پویا و بالقوه احیا کننده است که می تواند تحت تاثیر نیازهای فیزیکی و برای ترمیم پس از آسیب، ریمودلینگ شود. استئوبلاست نقش مهمی را در رسوب موادمعدنی به شکل کریستال های هیدروکسی اپاتیت ساخته شده از کلسیم هیدروکسی فسفات بر عهده دارد. بلوغ استئوبلاست ها به دو مسیر تکثیر و افتراق بستگی دارد. افتراق و معدنی سازی در استئوبلاست ها مختلف افتراق استئوبلاست ها به وسیله بیان ژن های خاص مشخص می شود. افتراق اولیه به وسیله بیان سطوح بالای آنزیم آلکالین فسفاتاز (*ALP*) و افتراق های بعدی به وسیله بیان استئوکلسین (*OC*) و استئوپوئتین مشخص می شود (۳). استئوکلسین به عنوان اسید گاما کربوکسی گلوتامیک اسید

بهشش گروه شش سری شامل: (۱) کنترل سالم؛ (۲) پراکساید هیدروژن؛ (۳) پراکساید هیدروژن + ویتامین دی؛ (۴) پراکساید هیدروژن + تمرين؛ (۵) پراکساید هیدروژن + تمرين و ویتامين دی؛ و (۶) شم (دی متیل سولفید اکساید-DMSO) تقسیم شدند.

#### تزریق پراکساید هیدروژن

رت‌های در گروه‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ تزریق درون صفاقی پراکساید هیدروژن (تهیه شده از شرکت Merck) را با دوز یک mmol/kg سه بار در هفته در روزهای زوج دریافت کردند (۱۲).

#### مکمل ویتامین دی

درمان با ویتامین دی در گروه‌های ۳ و ۵ به این صورت بود که رتها  $\mu\text{gram}/\text{kg}$  ۰/۵ میکروگرم ویتامین دی به صورت تزریق روزانه درون صفاقی طی ۸ هفته دریافت کردند (۱۷). از آمپول ویتامین دی با نام تجاری DITHRECOL از شرکت کاسپین ویتامین، تهران، ایران با غلظت UI/ml ۳۰۰۰۰ استفاده شد. جهت رسیدن به دوز مناسب تزریقی از نرمال سالین برای رقیق کردن و از دی متیل سولفوكساید جهت حل کردن ویتامین دی در سالین استفاده شد. با توجه به لزوم بررسی تاثیر حلال مذکور یک گروه بنام DMSO تعریف شد که روزانه فقط حلال دریافت کردند.

#### برنامه تمرين

رت‌های گروه‌های ۴ و ۵ به طور روزانه فعالیت تمرينی منظم بر روی تردمیل به مدت ۸ هفته انجام دادند. رتها در هفته اول با سرعت ۸ m/min و شیب ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه بر روی تردمیل تمرين کردند، در هفته دوم با سرعت ۱۲ m/min با شیب و زمان مشابه، در هفته سوم با سرعت ۱۶ m/min با شیب مشابه به مدت ۴۵ دقیقه و در چهارمین هفته با سرعت ۲۰ m/min با شیب مشابه به مدت ۴۵ دقیقه تمرين کردند. طی هفته‌های پنجم تا هشتم رتها در سرعت ۲۰ m/min با زاویه د درجه به مدت ۶۰ دقیقه هر روز تمرين داده شدند (جدول ۱) (۱۸).

در حالی که بر سایر بافت‌هایی نظری کبد، کلیه، شش‌ها، مغز و قلب بررسی شده است (۱۲-۱۵)، همچنان شواهد رو به رشد افزایش پوکی استخوان در مردان ایرانی در مقایسه با همتایان آمریکایی (۱۶) نیز بر ضرورت انجام این پژوهش تاکید دارد، لذا مطالعه حاضر به هدف بررسی اثر  $\text{H}_2\text{O}_2$ ، فعالیت بدنی و مصرف ویتامین دی بر بیان ژن‌های درگیر در روند استئوژنیک موش‌های نر انجام شد.

#### روش بررسی

در این کارآزمایی تجربی با طرح پس آزمون ۳۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن  $۲۰\pm ۲۰$  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  $۲۲\pm ۲$  درجه سانتی گراد، رطوبت  $۵۰\pm ۵$ %، چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. رتها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. رژیم غذایی رتها (شرکت غذایی دام پارس، تهران، ایران) از ذرت زمین، یونجه، کنجاله سویا، گندم، ویتامین‌ها، موادمعدنی، جوش‌شیرین و نمک بر اساس ۵/۵۵٪ کربوهیدرات، ۵/۱۷٪ پروتئین، ۱/۹۵٪ چربی (ماده آلی محلول در اتر؛ EE)، ۰/۵۶٪ کلریم، ۰/۶۲٪ تی فسفر، ۶/۶٪ فیبر خام، انرژی متابولیزه شدن ۳/۱۶ kcal/g (ME) تشکیل شده بود. این اطلاعات توسط شرکت تولیدکننده ارائه شده است. معیار ورود شامل: موش‌های سالم‌نر، نژاد ویستار، حداقل سن هشت هفته و وزن بالای ۱۸۰ گرم بود و معیار خروج شامل: مشاهده هر گونه بیماری یا کسالت در موش‌ها، کاهش وزن محسوس، حساسیت غذایی، هر گونه تماس پراکساید هیدروژن با پوست و عدم تمرين پذیری بود.

#### گروه بندی حیوانات

پیش از گروه‌بندی، موش‌ها یک هفته برای آشنایی با نحوه فعالیت بر نوارگردان دویدند. سپس نمونه‌ها به طور تصادفی

## جدول ۱: پروتکل تمرین پژوهش

گرفت و نمونه‌ای که اتانول به آن اضافه شده بود به RB Mini Column انتقال یافت و با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm به مدت یک دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. در مرحله بعد ۵۰۰ μl از RB Wash Buffer1 به مدت ۱۴۰۰۰ rpm با سرعت mn Mini Colu Collection Tube اضافه گردید و محلول درون RB Mini Column با ۷۵۰ μl از RB Wash Buffer2 به مدت یک دقیقه دور ریخته شد. در ادامه ۱۴۰۰۰ rpm با سرعت Collection Tube دور ریخته سانترفیوژ گردید و محلول درون RB Mini Column به مدت یک دقیقه2 سانترفیوژ شد و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. این مرحله دوبار تکرار شد، سپس به مدت سه دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانترفیوژ انجام شد. سپس RB Mini Column درون Elution Tube قرار داده شد و ۵۰ μl از RNase-free ddH<sub>2</sub>O به RB Mini Column اضافه شد و یک دقیقه به آن زمان داده شد و بعد از یک دقیقه به مدت دو دقیقه Elution با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانترفیوژ گردید. محلول درون RNAهای استخراج شده بود که در ۷۰- نگهداری شدند. سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمانتاز (K1622) تهیه گردید. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid<sup>TM</sup>M-MuLV Reverse transcriptas صورت گرفت. هنگام تهیه cDNA از نمونه تخلیص شده پس از قرائت جذب، حجمی شامل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته، سپس نیم میکرولیتر Random Hexamers (الیگوڈئوکسی ریبو نوکلوتید که به عنوان یک پرایمر برای شروع سنتز cDNA استفاده می‌شود)، نیم میکرولیتر پرایمر oligodT و تا حجم ۱۲ میکرولیتر آب به کیت اضافه گردید و به دمای ۶۵ درجه برای پنج دقیقه منتقل گردید. و سپس به مدت دو دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد ۴ μl از ۵X RiboLock و ۲ μl dNTP Mix از Reaction Buffer

نحوه استخراج نمونه و اندازه‌گیری بیان ژن  
بیست و چهار ساعت پس از آخرین جلسه و بعد از ۱۲ ساعت گرسنگی، موش‌های صحرایی با استنشاق کلروفرم بیهودش شدند، سپس به وسیله خونگیری مستقیم از قلب، قربانی شدند. استخراج بافت استخوان تیبیا موش‌ها توسط متخصص انجام شد. سپس نمونه‌ها در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شدند و برای اندازه‌گیری بیان ژن استئوکلسین و آکالین فسفاتاز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی‌درنگ (real-time polymerase chain reaction- RealTime PCR) در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA بر اساس دستورالعمل کیت استخراج RNA ساخت شرکت یکتا تجهیز، با استفاده از محلول‌های کیت استخراج و پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. برای این منظور ۳۰ میلی‌گرم بافت استخوان را در نیتروژن مایع خشک و پس از کوبیدن در آونگ استریل، درون تیوب یک و نیم قرار گرفت. اولین مرحله برای استخراج RNA از سلول‌های حیوانی از بین بردن دیواره سلول‌ها با کمک یک بافر لیزکننده (در اینجا RB Buffer) می‌باشد، لذا ۱۱ μl ۳۵۰ از RB Buffer به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد (از قبل به ازای هر یک میلی لیتر ۱۰ میکرولیتر  $\beta$ -mercaptoethanol نیز به بافر اضافه شده بود) و بهمدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد درون Filter Column Collection Tube مخلوط نمونه به Filter Column منتقال داده شد و قرار گرفت و با دور ۱۴۰۰۰ rpm بهمدت دو دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول روشن از Collection Tube به یک تیوب ۳۵۰ μl اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه گردید سپس به خوبی میکروسانتریفیوژ جدید منتقال یافت. سپس هم حجم آن یعنی ۳۵۰ μl Collection Tube درون RB Mini Column قرار گرفت، شد.

سنجدیده شد، سپس با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  میزان بیان ژن‌ها محاسبه گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی طبیعی بودن توزیع یافته‌ها از آزمون شاپیروویلک و همچنین جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون‌های  $t$  مستقل، آنالیز واریانس دو طرفه همراه با آزمون تعییبی بنفرونی در نرمافزار 16 SPSS version استفاده شد ( $p \leq 0.05$ ).

### ملاحظات اخلاقی

تمام اصول کار با حیوانات طبق بیانیه هلسينکی سال ۲۰۰۸ و کد اخلاق از کمیته اخلاق وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان کرمان به شماره IR.KMU.REC.1396.1562 تاییدیه پروپوزال از گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز صورت گرفت.

برای پنج دقیقه در دمای ۶۵ قرار گرفته بود اضافه شد. سپس ترکیب ابتدا به مدت پنج دقیقه در دمای ۲۵ قرار گرفت. بعد از آن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ قرار گرفت. در آخر به منظور از کار افتادن آنزیم RT، تیوب‌های واکنش به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. دمای cDNA آماده شده جهت انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. دمای اتصال برای همه پرایم‌ها  $60^{\circ}\text{C}$  بود. لازم به ذکر است که از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد. توالی پرایم‌های مورد استفاده نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشرفلورسانس با محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به GAPDH و حالت کنترل  $\Delta Ct = Ct_{\text{Treat}} - Ct_{\text{Un Treat}}$  و  $\Delta Ct_{\text{interacts}} = Ct_{\text{GAPDH}}$  که فاقد محیط‌های تمایزی است با استفاده از فرمول

جدول ۲: توالی پرایم‌ها برای RT-PCR

نام ژن	توالی پرایم‌ها [۳'-> ۵']
استئوکلسین	<i>Fwd: AATAGACTCCGGCGCTACCT</i> <i>Rev: GAGCTCACACACCTCCCTGT</i>
آلکالین‌فسفاتاز	<i>Fwd: GTGCCCTGACTGAGGCTGTC</i> <i>Rev: GGATCATCGTGTCTGCTCAC</i>
GAPDH	<i>Fwd: GACAACTTGGCATCGTGGAA</i> <i>Rev: ATGCAGGGATGATGTTCTGG</i>

نتایج آزمون آنالیز واریانس دو طرفه در جدول ۴ نشان داد هشت هفته تمرین ( $F=0/24$ ,  $P=0/02$ ) اثر، هشت هفته تمرین ( $F=0/88$ ,  $P=0/001$ ) اثر، مصرف ویتامین دی ( $F=0/97$ ,  $P=0/0001$ ) اثر معنی‌داری بر افزایش  $OC$  بافت استخوان موش‌های صحرایی مسموم شده با پراکساید هیدروژن داشت. همچنین اثرات تعاملی تمرین همراه با مصرف ویتامین دی بر  $OC$  بافت استخوان موش‌های صحرایی مسموم شده با پراکساید هیدروژن ( $F=0/34$ ,  $P=0/005$ ) اثر معنادار داشت. نتایج آزمون تعییبی بنفرونی نشان داد، اثر مداخلات

### نتایج

سطح بیان ژن استئوکلسین و آلکالین‌فسفاتاز بافت استخوان موش‌های صحرایی در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج آزمون  $t$  مستقل نشان داد مصرف پراکساید هیدروژن اثر معنی‌داری بر کاهش بیان ژن  $OC$  ( $t=-18/3$ ,  $p=0/001$ ) و  $ALP$  ( $t=-3/1$ ,  $p=0/02$ ) بافت استخوان موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه کنترل داشت، در حالی که اثر تزریق  $DMSO$  در مقایسه با گروه کنترل در متغیرهای  $OC$  ( $t=-1/4$ ,  $p=0/22$ ) و  $ALP$  ( $t=1/7$ ,  $p=0/14$ ) معنادار نبود.

همراه با مصرف ویتامین دی نیز اثرات تعاملی در افزایش *ALP* بافت استخوان موش‌های صحرایی مسموم شده با پراکساید هیدروژن داشت ( $F = 31/17$ ,  $P = 0.0001$ ,  $\alpha = 0.05$ ). نتایج آزمون تعقیبی بنفرونی نشان داد تاثیر (جدول ۴). مداخلات گروه ۵ نسبت به گروه‌های ۳، ۲ و ۴ بر افزایش *ALP* مداخلات گروه ۵ نسبت به گروه‌های ۳، ۲ و ۴ بر افزایش *ALP* به طور معناداری بیشتر است ( $p=0.001$ ). اما تفاوتی بین گروه‌های پراکساید هیدروژن + ویتامین دی با پراکساید هیدروژن + تمرین دی ( $F = 74/75$ ,  $P = 0.0001$ ,  $\alpha = 0.05$ ) نداشت. اگرچه مداخلات این دو گروه نسبت به گروه پراکساید هیدروژن در افزایش *ALP* معنادار بود (شکل ۲).

گروه‌های ۵ و ۳ در مقایسه با گروه‌های ۲ و ۴ در افزایش *OC* به طور معناداری بیشتر بود ( $p=0.001$ ). همچنین گروه پراکساید هیدروژن + تمرین نسبت به گروه پراکساید هیدروژن سبب افزایش معنادار *OC* شد ( $F = 0.04$ ,  $P = 0.0001$ ). اما تفاوتی بین گروه پراکساید هیدروژن + ویتامین دی با پراکساید هیدروژن + ویتامین دی در *OC* مشاهده نشد (شکل ۱). هشت هفته تمرین ( $F = 0.79$ ,  $P = 0.0001$ ,  $\alpha = 0.05$ ) و مصرف ویتامین دی ( $F = 0.75$ ,  $P = 0.0001$ ,  $\alpha = 0.05$ ) اثر معنی‌داری بر افزایش *ALP* بافت استخوان موش‌های صحرایی مسموم شده با پراکساید هیدروژن داشت. تمرین

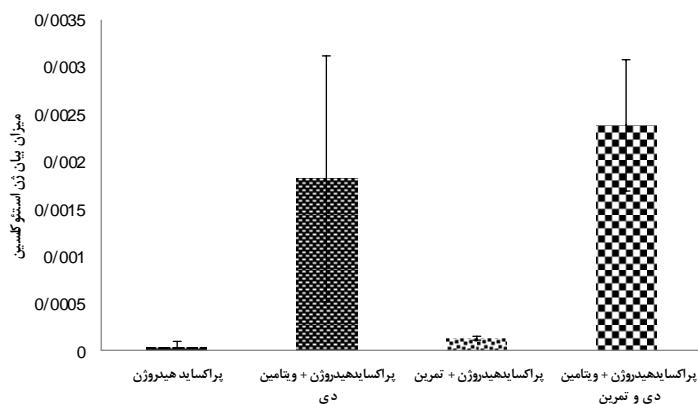
جدول ۳: مقادیر بیان ژن استئوکلسین و آلکالین‌فسفاتاز در گروه‌های سالم و تزریق پراکساید هیدروژن با مداخله تمرین و ویتامین دی

متغیر	گروه	استئوکلسین	آلکالین‌فسفاتاز	انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین
کنترل سالم		$0.00109 \pm 0.0005$	$0.00118 \pm 0.0002$			
دی متیل سولفید اکساید		$0.00059 \pm 0.0002$	$0.00104 \pm 0.0008$			
پراکساید هیدروژن		$0.00388 \pm 0.0039$	$0.00003 \pm 0.0002$			
پراکساید هیدروژن + تمرین		$0.00124 \pm 0.0015$	$0.00013 \pm 0.0007$			
پراکساید هیدروژن + ویتامین دی		$0.00157 \pm 0.0005$	$0.00239 \pm 0.0013$			
پراکساید هیدروژن + تمرین و ویتامین دی		$0.00675 \pm 0.0011$	$0.00182 \pm 0.0007$			

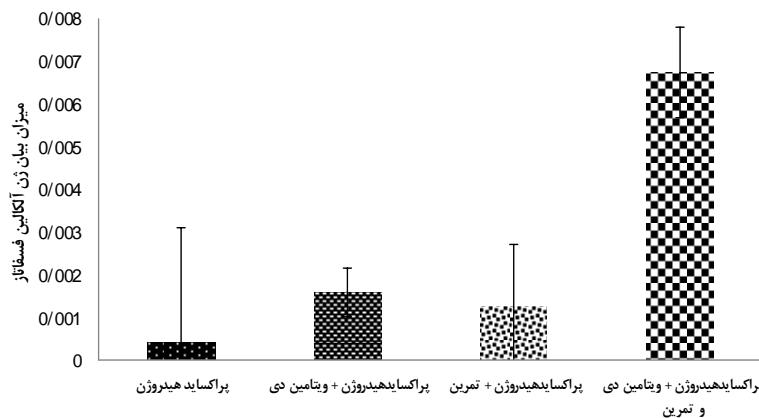
جدول ۴: نتایج آزمون آنواهی دو راهه جهت بررسی اثر پراکساید هیدروژن، تمرین و ویتامین دی بر متغیرهای تحقیق

متغیر	تمرين	<i>ALP</i>	ویتامین دی		تعامل		اندازه اثر	اندازه اثر	ویتامین دی	تعامل	اندازه اثر
			P	F	P	F					
استئوکلسین		$0/24$	$0/028$	$0/028$	$0/028$	$0/028$	$0/0001$	$0/0001$	$0/0001$	$0/0001$	$0/0001$
آلکالین‌فسفاتاز		$0/79$	$0/74$	$0/74$	$0/74$	$0/74$	$0/0001$	$0/0001$	$0/0001$	$0/0001$	$0/0001$

۳: اثر معنادار تمرین بر افزایش *OC* و *ALP*; ۴: اثر معنادار ویتامین دی بر افزایش *OC* و *ALP*; ۵: اثر معنادار تعلیم تمرین و ویتامین دی بر افزایش *OC* و *ALP*.



شکل ۱: میانگین بیان ژن اسنوکلیسین بافت استخوان در گروه های تزریق پراکساید هیدروژن با مداخله تمرين و ویتامین دی  
 a: تفاوت معنادار گروه آزمایشی نسبت به گروه ویتامین دی ( $p<0.05$ )  
 b: تفاوت معنادار گروه آزمایشی نسبت به گروه تمرين + ویتامین دی ( $p<0.05$ )  
 c: تفاوت معنادار گروه های آزمایشی نسبت به گروه تمرين ( $p<0.05$ )



شکل ۲: میانگین بیان ژن آلکالین فسفاتاز بافت استخوان در گروه های تزریق پراکساید هیدروژن با مداخله تمرين و ویتامین دی  
 a: تفاوت معنادار گروه آزمایشی نسبت به گروه تمرين + ویتامین دی ( $p<0.05$ )

ویتامین دی سبب بیشترین افزایش در مقایسه با سایر گروهها شد. کاهش معنادار بیان ژن آلکالین فسفاتاز و استئوکلیسین در گروه پراکساید هیدروژن در مقایسه با گروه کنترل سالم حاکی از اثرات مخرب آن بر بافت استخوان بود، اما مکمل یاری ویتامین دی فعالیت آلکالین فسفاتاز را افزایش داد و سبب افزایش چشمگیر بیان استئوکلیسین شد. پژوهش‌های بسیاری تاثیر مصرف مکمل ویتامین دی را بر استخوان مورد پژوهش قرار دادند و نشان می‌دهند که اثرات ویتامین دی بر استخوان همچون یک تیغ دولبه است، چراکه اگرچه تاثیر آن بر فعالیت آلکالین فسفاتاز، سطوح استئوکلیسین، استئوبوئتین و کلژن نوع I در تایید یافته‌های این پژوهش مثبت گزارش شده است،

## بحث

در مطالعه حاضر با تزریق پراکساید هیدروژن به موش‌های نر سعی شد استرس اکسیداتوی در بدن آنها القا شود، سپس با انجام مداخله تمرينی به شکل هوازی و تغذیه (صرف ویتامین دی) روند استئوزیک را در موش‌ها مورد بررسی قراردادیم. نتایج نشان داد که مداخلات تمرين، مکمل ویتامین دی و تعامل آنها در افزایش بیان ژن‌های استئوکلیسین و آلکالین فسفاتاز معنادار بود. بیشترین افزایش در بیان ژن استئوکلیسین در گروه‌های پراکساید هیدروژن + ویتامین دی و پراکساید هیدروژن + تمرين و ویتامین دی مشاهده شد، اما در بیان ژن آلکالین فسفاتاز گروه پراکساید هیدروژن + تمرين و

همکارانش (۲۰۱۳) افزایش در مقادیر سرمی آلکالین فسفاتاز را با انجام ۴۰ پرش در هفته گزارش دادند در حالی که با تغییر در بار تمرین و برنامه تمرین پرش نتوانستند تغییری در مقادیر سرمی استئوکلسین گزارش کنند (۲۲). تمرین اثر استخوان سازی بر متابولیسم استخوان دارد. سیستم اسکلتی ما به گونه‌ای است که تحت تاثیر بار مکانیکی ناشی از جاذبه و انقباض عضلانی روند ریمودلینگ را از طریق انتقال مکانیکی تحریک می‌کند. انتقال مکانیکی در واقع به معنای پاسخ بیوشیمیابی به واسطه تحریک مکانیکی است. در اینجا تحریک مکانیکی ناشی از فعالیت بدنی منجر به تقویت و بهبود متابولیسم استخوان شد. مطالعه حاضر نشان داد که اثر مفید فعالیت بدنی بر استخوان سازی تحت تاثیر استرس اکسیداتیو سیستمی حداقل به واسطه ترریق پراکساید هیدروژن قرار نمی‌گیرد. تاثیر فعالیت بدنی و بار مکانیکی بر استخوان تاکنون به اشکال مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۶). یکی از فواید فعالیت بدنی افزایش گردش خون در عضلات و استخوان‌ها است که اکسیژن، مواد غذایی و هورمون‌های لازم را در اختیار بافت قرار می‌دهد. افزایش توده عضلانی به واسطه فعالیت بدنی کشش بیشتری برای اتصالات استخوانی-تاندونی وارد می‌کند که سبب تحریک عوامل استخوان ساز و افزایش مواد معدنی و توده استخوان می‌شود (۶). بار تحمیل شده به وسیله ترمیل تشکیل استخوان را تحریک کرده، از کاهش استخوان در موش‌ها می‌کاهد. شواهد بسیار قوی وجود دارد که نشان می‌دهد عدم فعالیت، سطوح mRNA مارکرهای جذب استخوان *TRACP*, کاتپسین و گیرنده‌های کلسی تونین را کاهش می‌دهد، در حالی که شرکت در فعالیت بدنی مارکرهای استئوژنیک نظیر استئوکلسین، آلکالین فسفاتاز، *RUNX2*, *BMP2* و کلاژن نوع I را در استئوبلاست‌ها افزایش می‌دهد (۲۳). به نظر می‌رسد فعالیت بدنی از طریق دستکاری *RANKL/RANK/OPG* سه مسیر مهم سیگنالینگ *Jagged/Notch 1 and 3* و *Wnt/βCatenin* اثرگذاری بر استئوبلاست‌ها می‌شود و توده استخوان را از طریق عملکرد استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها تنظیم می‌کند

اما اثرات آن بر معدنی شدن استخوان در برخی پژوهش‌ها مثبت و در برخی منفی گزارش شده است (۳, ۱۹). همچنان مصرف دوزهای بالای ویتامین دی یا کمبود کلسیم ممکن است سبب شود ویتامین دی روند استئوکلاستوزنیزیز را افزایش دهد (۲۰). پژوهش رهام و همکارانش (۲۰۱۸) بر موش‌های آورکتومی شده نشان داد که مصرف مکمل ویتامین دی و کلسیم با افزایش سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین همراه بود، که یافته‌های این پژوهش را تایید کرد (۲۱). به نظر می‌رسد تنظیمات موضعی ویتامین دی تحت تاثیر وضعیت کلسیم و مرحله افتراق سلول‌های استخوانی باشد (۱۹). تاثیر مستقیم آنابولیکی ویتامین دی در استخوان وابسته به فعالیت گیرنده ویتامین دی (VDR) است. فعالیت VDR در استئوبلاست‌های بالغ هر دو وضعیت آنابولیکی و ضد کاتابولیکی را سبب می‌شود. تاثیرات ضد جذبی در استخوان وابسته به کاهش در نسبت *RANKL/OPG* است؛ در مقابل تاثیرات آنابولیکی آن مربوط به افزایش در بیان مسیر سیگنالینگ *LRP5/Wnt* است (۲۰). همچنان زن استئوکلسین حاوی بخش پاسخ‌دهنده به ویتامین دی است که باعث می‌شود بیان استئوکلسین را از طریق مسیر *VDR-VDRE* در موش‌ها و استئوبلاست‌های انسان افزایش دهد (۴) که می‌تواند بخشی از دلایل افزایش قابل توجه بیان زن استئوکلسین را توضیح دهد. همچنان نتایج این پژوهش نشان داد تمرین هوازی روشی موثر در افزایش بیان زن آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین در موش‌های مسموم شده با پراکساید هیدروژن است. در تایید یافته‌های این پژوهش ژانگ و همکارانش (۲۰۱۷) افزایش در بیان زن استئوکلسین را در موش‌های پنج هفتۀ ای که به طور متوسط ۵۰۰۰ متر در هر روز چرخ می‌زدند نشان دادند (۷). همچنان در پژوهش ناگوئیرا و همکارانش (۲۰۱۶) بیان زن استئوکلسین در موش‌هایی که چهار هفتۀ بر ترمیل دویتدند نیز افزایش یافت (۶). گزینالوئی و همکارانش (۲۰۱۵) نیز نشان دادند در موش‌های اورکتومی شده فعالیت به همراه مصرف مکمل نارنجینگ بیشترین افزایش را در بیان زن استئوکلسین در مقایسه با موش‌های گروه کنترل ایجاد کرد (۹). اووبی و

متغیرهای یاد شده در هر یک از مداخلات، نتیجه‌های دور از انتظار نبود. این پژوهش برای اولین بار انجام شد تا بیان ژن‌های استئوژنیک را در بافت استخوان موش‌های مسموم شده با پراکساید هیدروژن مورد بررسی قرار دهد، چنانچه در این پژوهش مقادیر بیان ژن متغیرهای جذب استخوان نیز اندازه‌گیری می‌شد بسیار سودمند بود. همچنین اندازه‌گیری میزان پروتئین استئوکلسانین و آلکالین‌فسفاتاز در بافت استخوان یا اندازه‌گیری چگالی مواد معدنی می‌توانست تاثیر مداخلات را به‌گونه محکم تری بر استخوان بیان دارد. لذا به سایر پژوهشگران پیشنهاد می‌شود علاوه بر بررسی متغیرهای یاد شده، پژوهشی بر گروه‌های سالم جهت مقایسه با گروه‌های تحت تزریق پراکساید هیدروژن انجام دهنند.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه تمرین و مصرف ویتامین دی اثرات ناشی از مسمومیت رادیکال آزاد در استخوان را تعديل می‌کنند، لذا این شیوه مداخلات می‌تواند در بیماران پوکی استخوان، افراد سالم‌مند یا بیمارانی که تحت تاثیر مقادیر افزایش یافته رادیکال آزاد در بدنشان هستند، مورد استفاده قرار بگیرد. اگرچه بررسی و تعمیم دقیق نتایج به انسان‌ها نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد.

### سپاس‌گزاری

بدین وسیله نویسنده‌گان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود از دکتر محمدعلی آذری‌آجانی، دکتر شیرین زیلانی بوری، دکتر مارینا شریعتی و دکتر غلامرضا کاکا به دلیل حمایت‌هایشان در اجرای طرح را اعلام می‌دارند، همچنین از دست اندکاران محترم دانشگاه کرمان و همکارانی که با یاری آن‌ها اجرای این پژوهش به پایان رسید سپاس‌گزاریم. مقاله حاضر از پایان نامه دکتری نویسنده اول با عنوان «تأثیر هشت هفته تمرین هوایی و مکمل یاری ویتامین دی بر بیان عوامل رشدی و مارکرهای بیوشیمیابی استخوان موش‌های نر مسموم شده با پراکساید هیدروژن» مستخرج گردیده است.

**حامي مالي:** ندارد.

**تعارض در منافع:** وجود ندارد.

(۲۳). افزایش بیان ژن استئوکلسانین و آلکالین‌فسفاتاز در این مطالعه نشان‌دهنده فعالیت استئوبلاستها در موش‌های تحت تمرین بود. این پژوهش برای اولین بار نشان داد که اثر تعاملی تمرین و ویتامین دی در افزایش بیان ژن آلکالین‌فسفاتاز و استئوکلسانین در موش‌های مسموم شده با تزریق صفاقی پراکساید هیدروژن موثر است. این نتایج حاکی از آن است که تمرین و مصرف ویتامین دی نقش مثبتی بر روند استئوژنیک دارد. پژوهش شریعتی و همکارانش (۲۰۱۹) که بر موش‌های مسموم شده با پراکساید هیدروژن انجام شد، نشان داد که سطوح سرمی استئوکلسانین و نه آلکالین‌فسفاتاز در گروه پراکساید هیدروژن<sup>+</sup> تمرین + ویتامین دی افزایش معنادار یافت (۲۴). این یافته‌ها حداقل با بخشی از نتایج این پژوهش همسان است. مقادیر آلکالین‌فسفاتاز نیز اگرچه در گروه تعاملی نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود اما معناداری آماری را به دست نیاورد. اگرچه یافته‌های به دست آمده (مقادیر سرمی در مقابل بیان ژن) کاملاً قابل مقایسه نمی‌باشند، اما شاید بتوان بیان داشت که تبدیل آنچه که به عنوان بیان ژن می‌شناسیم به پروتئین‌های در دسترس در سرم به زمان زیادی نیاز دارد و ممکن است افزایش‌های مشاهده شده در این پژوهش به‌طور دقیق بازتابی از افزایش در استئوکلسانین سرم یا عدم مشاهده تغییر در آلکالین‌فسفاتاز نباشد. ضمناً همانگونه که محقق در پژوهش اشاره کرده‌اند، منابع ترشح آلکالین‌فسفاتاز در سرم متعدد است و اندازه‌گیری بیان ژن آن به درستی نشان از افزایش فعالیت استئوبلاستها دارد. پژوهش آکاگاوا و همکارانش (۲۰۱۸) نشان داد که مصرف فرم فعل ویتامین دی به شکل آلفاکلسیدول (Alfacalcidol) به‌هرمراه فعالیت هوایی کم شدت برای ۲ هفته یا ۶ هفته همراه با تاثیراتی بر استخوان است. آنها نشان دادند که شش هفته تاثیر همزمان فعالیت و آلفاکلسیدول با افزایش معدنی شدن استخوان همراه است (۲۵). اگرچه در این پژوهش سایر مارکرها اندازه‌گیری نشد، اما افزایش BMD به طور غیر مستقیم بازتابی از افزایش در فعالیت مارکرهای استئوژنیک بود. در این پژوهش همانگونه که بیان شد تاثیر تعاملی بر افزایش استئوکلسانین و آلکالین‌فسفاتاز معنادار بود که با توجه به افزایش

## References:

- 1-Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, et al. *Oxidative Stress Inhibits Osteoblastic Differentiation of Bone Cells by ERK and NF-Kb.* Biochem Biophys Res Commun 2004; 314(1): 197-207.**
- 2-Bartell SM, Kim HN, Ambrogini E, Han L, Iyer S, Ucer SS, et al. *Foxo Proteins Restrain Osteoclastogenesis and Bone Resorption by Attenuating H 2 O 2 Accumulation.* Nat Commun 2014; 5: 3773.**
- 3-Lancaster C, Harrison R. *Effects of Vitamin D, K1, And K2 Supplementation on Bone Formation by Osteoblasts in Vitro: A Meta-Analysis.* J Biom Biostat 2017; 8(4): 365.**
- 4-Li J, Zhang H, Yang C, Li Y, Dai Z. *An Overview of Osteocalcin Progress.* J Bone Miner Metab 2016; 34(4): 367-79.**
- 5-Tartibian B, Sheikhlu Z, Malandish A, Rahmati-Yamchi M, Afsargarebag 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): 723-34. [Persian]**
- 6-Nogueira JE, Branco LG, Issa JPM. *Bone Repair: Effects of Physical Exercise and LPS Systemic Exposition.* Injury 2016; 47(8): 1828-34.**
- 7-Zhang J ,Valverde P, Zhu X, Murray D, Wu Y, Yu L, et al. *Exercise-Induced Irisin in Bone and Systemic Irisin Administration Reveal New Regulatory Mechanisms of Bone Metabolism.* Bone Research 2017; 5: 16056.**
- 8-Hell R, Ocarino N, Boeloni J, Silva J, Goes A, Santos R, et al. *Physical Activity Improves Age-Related***
- Decline in the Osteogenic Potential of Rats' Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.* Acta Physiol 2012; 205(2): 292-301.**
- 9-Xiaolei S, Fengbo L, Xinlong M, Jianxiong M, Bin Z, Zhang Y, et al. *The Effects of Combined Treatment with Naringin and Treadmill Exercise on Osteoporosis in Ovariectomized Rats.* Sci Rep 2015; 5: 1-9.**
- 10-Tartibian B, Motabsae N, Tolouei-Azar J. *The Influence of Nine-Week Intensive Aerobic Exercises, Calcium and Vitamin D Supplementation on the Metabolic Response of Bone Formation Biomarkers.* Zahedan J Res in Medical Sci 2013; 15(2): e93098. [Persian]**
- 11-Cicek E, Cakmak E. *Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Damage on Mineral Density and Mechanical Properties of Bone.* Braz Arch Biol Technol 2018; 61: E18180043.**
- 12-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(2): 248-51.**
- 13-Ganie SA, Haq E, Hamid A, Masood A, Zargar MA. *Long Dose Exposure of Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Albino Rats and Effect of Podophyllum Hexandrum on Oxidative Stress.* Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15(8): 906-15.**
- 14-Li SF, Liu HX, Zhang YB, Yan YC, Li YP. *The Protective Effects of A-Ketoacids Against Oxidative Stress on Rat Spermatozoa in Vitro.* Asian J Androl 2010; 12(2): 247.**

- 15-Safrazadeh Gargari S, Matin Homaei H, Azarbayjani Ma. *Effects of Continues Exercise on BAX and BCL-2 Heart Proteins Following by Different Dos of H2O2 Consumption in Rat Male.* J Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 2018; 26(4): 363-79. [Persian]
- 16-Omrani GR, Masoompour SM, Hamidi A, Mardanifard HA, Taghavi SM, Talezadeh P, et al. *Bone Mineral Density in the Normal Iranian Population: A Comparison with American Reference Data.* Arch Osteoporos 2006; 1(1-2): 29-35.
- 17-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(4): 116.
- 18-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(1): 75-82.
- 19-Gunton JE, Girgis CM, Baldoock PA, Lips P. *Bone Muscle Interactions and Vitamin D.* Bone 2015; 80: 89-94.
- 20-Goltzman D. *Functions of Vitamin D in Bone.* Histochem Cell Biol 2018; 149(4): 305-12.
- 21-Mustafa RA, Alfky NA, Hijazi HH, Header EA, Azzeh FS. *Biological Effect of Calcium and Vitamin D Dietary Supplements Against Osteoporosis in Ovariectomized Rats.* Progress in Nutrition 2018; 20(1): 86-93.
- 22-Foong Kiew Ooi, Rabindarjeet S, Harbindar JS, Yoshihisa U. *Effects of Jumping Exercise and Subsequent Short and Long Term Cessation of Exercise on Bone in Female Rats.* Malays J Med Sci. 2008; 15(1): 119-31.
- 23-Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, Jafarnejad S. *RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved In Exercise-Induced Bone Remodeling.* Biomed Res Int 2020; 2020: 1-11.
- 24-Shariati M, Azarbayjani MA, Zilaei Bouri S, Kaka G. *The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercise and Vitamin-D Supplementation on Osteocalcine and Alkaline Phosphatase in Rats Poisoned with H2O2.* Iranian J Nutr Sci & Food Tech 2019; 14(2): 1-10.
- 25-Akagawa M, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Ono Y, Yuasa Y, Nagahata I, et al. *Effects of Activated Vitamin D, Alfacalcidol, And Low-Intensity Aerobic Exercise on Osteopenia and Muscle Atrophy in Type 2 Diabetes Mellitus Model Rats.* Plos One 2018; 13(10): E0204857.

## Effect of Eight Weeks Aerobic Exercise and Vitamin-D Supplementation on Osteocalcin and Alkaline Phosphatase Gene Expression in Male Rats Poisoned with Hydrogen Peroxide

Ramin Eimari Eskandari<sup>1</sup>, Hassan Matin Homae<sup>†1</sup>, Lida Moradi<sup>2</sup>

### Original Article

**Introduction:** Free radicals increase with age and disease, so the aim of this study was to investigate the effect of exercise and vitamin D on the expression of alkaline phosphatase and osteocalcin genes in bone tissue of rats poisoned with hydrogen peroxide.

**Methods:** In this experimental trial, 36 adult male Wistar rats were randomized into six groups of six rats, 1) control; 2) hydrogen peroxide; 3) hydrogen peroxide + vitamin D; 4) hydrogen peroxide + exercise; 5) hydrogen peroxide + exercise and vitamin D and 6) Sham. For eight weeks, groups 2, 3, 4, and 5 were given daily dose of 1 mmol/kg hydrogen peroxide on even days, groups 3 and 5 received 0.5 mg / kg of Vitamin-D daily, and sham group received only vitamin D solvent intraperitoneally. Groups 4 and 5 performed aerobic exercise 3 day/week. Osteocalcin and alkaline phosphatase gene expression were measured by PCR and were analyzed using independent t-test, two-way analysis of variance and Boferroni's post hoc test with SPSS 16 ( $p \leq 0.05$ ).

**Results:** The interactive effect of exercise and vitamin D on increasing alkaline phosphatase and osteocalcin was significant. ( $p \leq 0.05$ ); exercise increased alkaline phosphatase and osteocalcin ( $p \leq 0.05$ ); vitamin D was also associated with increased alkaline phosphatase and osteocalcin ( $p=0.0001$ ). The greatest effect on increasing osteocalcin and alkaline phosphatase showed in groups 5 and 3, respectively ( $p=0.001$ ).

**Conclusion:** Exercise and vitamin D had a positive effect on bone tissue, so that even the systemic effect of hydrogen peroxide could not change the results of this constructive effect.

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

**Citation:** Eimari Eskandari R, Matin Homae H, Moradi L. **Effect of Eight Weeks Aerobic Exercise and Vitamin-D Supplementation on Osteocalcin and Alkaline Phosphatase Gene Expression in Male Rats Poisoned with Hydrogen Peroxide.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 29(7): 3931-42.

<sup>1</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Department of Physical Education & Sport Sciences, Faculty of Human Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 9123680810, email: hasanmatinhomae@gmail.com