

## تأثیر تعاملی مصرف HMB-FA و فعالیت ورزشی مقاومتی برون گرا بر آپوپتوزیس سلولی رت های نر بالغ

پارمیدا حاجی خانی<sup>۱</sup>، حجت الله نیک بخت<sup>۲\*</sup>، نادر شاکری<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۵

تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱۰/۱۲

ص ص: ۵۱-۳۳

### چکیده

بتا- هیدروکسی بتا- متیل بوتیرات (HMB) یکی از مکمل هایی است که با کاهش تجزیه پروتئین سلول و فراهم کردن پیش سازهای سنتز کلاسترول غشای سلول، سبب حفظ و بهبود توده عضلانی می شود. یک کاندید بالقوه برای افزایش هورمون های آنابولیک، توسعه توده و رشد عضلانی تحت شرایط مختلف است. هدف از تحقیق حاضر تبیین تأثیر تعاملی مصرف HMB-FA و ورزش مقاومتی برون گرا بر آپوپتوز سلولی در رت های بالغ نر بود. بیست و چهار راس رت نر بالغ به چهار گروه مساوی شامل گروه کنترل، HMB، ورزش و HMB، تقسیم شدند. پس از سه جلسه آشنا سازی گروه های تجربی با تمرین و به دست آوردن 1RM آنها، دو هفته بارگیری مکمل مورد نظر بصورت روزانه اجرا شد. سپس، یک جلسه فعالیت مقاومتی برون گرا اجرا شد. پس از اتمام پروتکل تمرینی رت ها کشته شده و پس از عملیات بافت برداری از طریق استخراج RNA بررسی سطوح کاسپاز ۳ و ۸ صورت گرفت. داده ها از طریق آزمون کالموگراف اسمیرنوف برای آمار توصیفی و آزمون من ویتنی و کروسکال والیس برای آمار استنباطی بررسی شدند. مصرف مکمل HMB-FA و فعالیت مقاومتی برون گرا بر کاسپاز ۳ و ۸ مؤثر بود و موجب کاهش سطوح این شاخص ها گشت، اما مکمل HMB-FA به تنهایی تأثیر معنی داری بر شاخص های مورد مطالعه نداشت. با توجه به نتایج مصرف مکمل HMB-FA و تمرین مقاومتی برون گرا

۱. استادیار دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
Parmida.hajikhani@ut.ac.ir

۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
hojnik1937@yahoo.com: (نویسنده مسئول)

۳. استادیار علوم ورزشی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
nsprofsport@yahoo.com

نمی‌تواند از آپوپتوز سلولی جلوگیری کند اما می‌تواند باعث کاهش سطوح کاسپاز ۳ و ۸ گردد. پیشنهاد می‌شود اثر مصرف HMB-FA همراه با مکمل لوسین و انقباض های برون‌گرا و درون‌گرا روی ترکیب بدنی به ویژه توده عضلانی انسان انجام شود.

**واژه‌های کلیدی:** مکمل HMB-FA، آپوپتوز سلولی، کاسپاز، رت، تمرین مقاومتی برون‌گرا



## The Interactive Effect of HMB-FA Consumption and Extrinsic Resistance Exercise Activity on Cell Apoptosis in Adult Male Rats

Parmida, Hajikhani<sup>1</sup>, Hojatalah, Nikbakht<sup>2\*</sup>, Nader, Shakeri<sup>3</sup>

### Abstract

Beta-Hydroxy Beta-Methyl Butyrate (HMB) is one of the supplements that preserves and improves muscle mass by reducing cell protein breakdown and providing cholesterol synthesis precursors for the cell membrane. A potential candidate for increasing anabolic hormones is mass development and muscle growth under various conditions. The aim of the current research was to explain the interactive effect of HMB-FA consumption and outdoor resistance exercise on cell apoptosis in adult male rats. Twenty-four adult male rats were divided into four equal groups including control group, HMB, exercise and HMB. After three sessions of familiarizing the experimental groups with exercise and obtaining their 1RM, two weeks of supplemental loading were implemented daily. Then, an extroverted resistance activity session was implemented. After finishing the training protocol, the rats were killed and after tissue removal, the levels of caspases 3 and 8 were checked through RNA extraction. The data were analyzed through Smirnov Kalmograph test for descriptive statistics and Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test for inferential statistics. The consumption of HMB-FA supplement and extrinsic resistance activity was effective on caspase 3 and 8 and decreased the levels of these indicators, but HMB-FA supplement alone had no significant effect on the studied indicators. According to the results of HMB-FA supplementation and external resistance training, it cannot prevent cell apoptosis, but it can reduce the levels of caspase 3 and 8. It is suggested

1. Assistant Professor of Sport Physiology Department, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Parmida.hajikhani@ut.ac.ir

2. Professor of Sport Physiology Department, Olume Tahghighat Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Corresponding Author\*:** hojnik1937@yahoo.com

3. Assistant Professor of Sport Physiology Department, Olume Tahghighat Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

nsprofsport@yahoo.com

that the effect of HMB-FA consumption along with leucine supplement and extrinsic and intrinsic contractions on body composition, especially human muscle mass.

**Keywords:** HMB-FA supplement, cell apoptosis, caspase, rat, exogenous resistance training

## مقدمه

تغذیه همراه با تمرین ورزشی، ابزار مهمی در کاهش خستگی، بهبود و عملکرد بهتر در فعالیتهای ورزشی است. در واقع، بسیاری از افراد سعی میکنند عملکرد ورزشی را با روشهای مختلفی افزایش دهند و استفاده از مکملها یکی از راهبردهای مهم تغذیه ای است (موقان<sup>۱</sup> و بورکه، ۲۰۱۱). مکمل بتا هیدروکسی بتا - متیل بوتیرات HMB متابولیت اسید آمینه کتوژنیک لوسین است که از متابولیسم اسید آمینه ضروری لوسین به میزان ۰/۴-۰/۳ گرم در روز تولید میشود (موجیکا<sup>۲</sup>، ۱۹۹۸). HMB به عنوان عامل توانمندسازی برای بهبود سطوح قدرت، افزایش هورمونهاى رشدی (تستوسترون ، IGF) و فعال شدن پروتئینهای مسیر سلولی و مولکولی هایپرتروفی و کاهش فاکتورهای التهابی و آتروفی عضلانی به تنهایی و همراه با تمرینات مقاومتی به کار میرود (لوترل<sup>۳</sup> و هالی ویل، ۲۰۱۵). امروزه با توجه به اهمیت HMB این مکمل با ترکیبات جدیدی همچون HMB-CA (کلسیم)، HMB- (COA استیل کوآنزیم A) و HMB-FA (اسید آزاد) تولید میشود در این میان HMB-FA به دلیل سرعت زیاد جذب و قابلیت دسترسی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. (وایت و ولز، ۲۰۱۳) اخیراً نشان داده شده است که سطوح پلاسمایی HMB-FA نسبت به HMB-CA در مدت زمان بسیار کوتاه (۳۶ در مقابل ۱۳۱ دقیقه) حدود دو برابر شده است (لیدر<sup>۴</sup> و گيسان، ۲۰۱۲). به همین علت مطالعات در این زمینه به همراه فعالیت مقاومتی آغاز شده است.

مصرف این مکمل در کنار الگوهای متفاوت تمرینهای مقاومتی، پاسخهای متفاوتی را ایجاد میکند، که در راستای اهداف ورزشکاران جهت بهبود ریکاوری به واسطه کاهش آسیب عضلانی پس از فعالیت و حفظ و نگهداری عضلات به واسطه تحریک مسیر هایپرتروفی بسیار حائز اهمیت است (هیلداهی<sup>۵</sup> و هیوبال، ۲۰۱۴). الگوهایی از تمرینات مقاومتی به واسطه شدت بالا موجب آزاد شدن کراتین کیناز (CK) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در خون میشوند (ایوانز<sup>۶</sup> و مریدیت، ۱۹۸۶). این دو آنزیم شاخص های تخریب عضلانی اند که تحت آسیب سلول های عضلانی، غلظت آن در سطوح سرمی افزایش می یابد. رهایی این فاکتورها موجب افزایش فاکتورهای التهابی، درد عضلانی و کاهش عملکرد در افراد میشود (فیلدینگ<sup>۷</sup> و مریدیت، ۱۹۹۱).

1. Maughan & Burke, Car
2. Mujika
3. Luttrell & Halliwill
4. Leeder & Gissane
5. Hyldahi & Hubal
6. Evans & Meredith
7. Fielding & Meredith

از طرفی بالا رفتن شاخص های التهابی و آسیب عضلانی در سطوح سرمی با تحریک هورمون های رشدی همچون تستوسترون همراه است (بنفی<sup>۱</sup> و کلومبینی، ۲۰۱۲). هر برنامه ورزشی شامل جلسات تمرینی با شدت فزاینده است که با جلسات کم حجم، کم شدت یا ریکاوری مجزا میشود (موری<sup>۲</sup> و ادینال، ۲۰۱۵). هموستاز بدن در جلسات تمرین مختل میشود و متعاقبا ظرفیت های عملکردی از طریق بیش جبرانی بهبود می یابد (موجیکا<sup>۳</sup>، ۱۹۹۸). بنابراین بخشی از تحقیقات فیزیولوژی ورزشی به چالش های یک جلسه فعالیت ورزشی اختصاص داده شده است ((لوترل<sup>۴</sup> و هالی ویل، ۲۰۱۵). فعالیت ورزشی که برای اولین بار انجام شده باشد، انقباض برونگرا، با شدت بالا یا برای مدت طولانی انجام گیرد، میتواند فشار بیشینه ای را بر عضله وارد کند (وایت<sup>۵</sup> و ولز، ۲۰۱۳)، که این فشار میتواند به صورت مکانیکی، متابولیکی یا ترکیبی از این دو باشد (لیدر و گیسان، ۲۰۱۲). فشار مکانیکی و متابولیکی به آسیب عضلانی (EIMD)، کوفتگی عضلانی و کاهش قدرت عضلانی منجر میشود و سلولهای ماهوارهای، سلولهای عروقی، فیبروبلاستها، و سلولهای التهابی (لکوسیت ها) را فعال میکند که متعاقبا ترمیم و بازسازی عضله اتفاق می افتد (هیلداهی و هیوبال، ۲۰۱۴).

در اغلب موارد، آسیب های عضلانی فعالیت های ورزشی، ناشی از اجرای نادرست انقباض های برونگراست. ویژگی بارز این نوع انقباض ها، اعمال فشار مضاعف به تارهای عضلانی، بافت نرم و در نتیجه آسیب عضله در اولین مرتبه انجام آنهاست. ایجاد آسیب و توسعه التهاب عضلانی ناشی از انقباض برونگرا در پژوهش های متعددی گزارش شده است. میزان سختی آن به شدت و مدت فعالیت، هم چنین سطوح یا وضعیت عملکرد تمرینی عضله وابسته است. (قنبری، ۱۳۸۹). تحمیل مکرر اضافه بار بر عضله باعث تحریک بافت برای سازگاری با اضافه بار می شود، اما افزایش بیش از حد بار تمرینی باعث ایجاد آسیب بافت نرم می گردد. این موضوع هنگام تمرینات مقاومتی افزایش می یابد. در نتیجه، ورزشکاران به بازگشت به حالت اولیه بیشتری نیاز دارند تا بتوانند بار تمرینی را به منظور بهبود عملکرد خود افزایش دهند. معمولا برنامه های تمرین مقاومتی یا ورزش های رقابتی اجازه ی بازگشت به حالت اولیه کامل بین جلسات تمرین یا مسابقه را به ورزشکار نمی دهند، در نتیجه شرایط کاتابولیکی در بافت عضلانی افزایش می یابد. اغلب آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی، به طور برجسته در نتیجه اجرای غیرعادی انقباض اکسنتریک است. ویژگی بارز این نوع انقباض، اعمال فشار مضاعف به فیبرهای عضلانی، بافت نرم و در

1. Benfi & Colombini
2. Murray & Adinala
3. Mujika
4. Luttrell & Halliwill
5. White & Wells

نهایت آسیب عضله در اولین مرتبه انجام آن‌ها، است (وارن<sup>۱</sup>، ۲۰۰۲). اگر چه انقباض اکسنتریک به لحاظ متابولیسم، انرژی کمتری نسبت به سایر فعالیت‌ها مطالبه می‌کند، اما این نوع انقباض موج آسیب‌های ریز عضلات اسکلتی، پاسخ التهابی قوی‌تر، هم چنین نسبت بزرگتری از استرس اکسایشی در مقایسه با فعالیت درونگرا (فعالیت‌هایی که در آن‌ها به هنگام انقباض، طول عضله کاهش می‌یابد) می‌شود (سومان<sup>۲</sup>، ۲۰۰۷).

HMB، مخفف بتا هیدروکسی بتا متیل بوتیرات، یک مکمل غذایی محبوب است که به دلیل پتانسیل آن برای کمک به رشد عضلانی و عملکرد ورزشی، توجه زیادی را در جامعه سلامت و تناسب اندام به دست آورده است. ورزشکاران و علاقه‌مندان به تناسب اندام همیشه به دنبال راه‌هایی برای بهبود عملکرد خود هستند. بتا-هیدروکسی بتا-متیل بوتیرات (HMB) یکی از مکمل‌هایی است که با کاهش تجزیه پروتئین سلول و فراهم کردن پیش‌سازهای سنتز کلسترول غشای سلول، سبب حفظ و بهبود توده عضلانی می‌شود. یک کاندید بالقوه برای افزایش هورمون‌های آنابولیک، توسعه توده و رشد عضلانی تحت شرایط مختلف است. این ماده حاصل تجزیه شیمیایی آمینواسید لوسین است که به طور معمول در کبد تولید می‌شود (دهخدا، ۱۳۸۳).

HMB متابولیت اسید آمینه شاخه دار لوسین می‌باشد. سال‌هاست که خاصیت آنتی کاتابولیکی لوسین شناخته شده است. (Hider RC F. E., 1960) لوسین پس از ورود به بدن توسط آنزیم KIC دی اکسیژناز تبدیل به KIC می‌شود، سپس KIC در میتوکندری توسط آنزیم آلفاکتواسید دهیدروژناز تبدیل به ایزووایلرل کوآ می‌شود اما در سیتوزول توسط آنزیم آلفاکتوایزوکاپروات دی اکسیژناز تبدیل به HMB می‌گردد (ون کوورینگ<sup>۳</sup>، ۱۹۹۲). HMB نیز مانند لوسین، خاصیت آنتی کاتابولیکی دارد که در کاهش تجزیه پروتئین عضله و آسیب‌های ناشی از فعالیت ورزشی هنگام تمرینات ناآشنا و شدید نقش دارد (ویلسون<sup>۴</sup>، ۲۰۰۹). تحت شرایط گوناگون، HMB عاملی بالقوه برای ترمیم و افزایش توده عضلانی است. HMB، متابولیتی از اسید آمینه‌ی شاخه دار لوسین است، که سبب کاهش تحلیل عضله همراه با تروما و سرطان می‌شود. به صورت اندوژن از متابولیسم اسید آمینه ضروری لوسین (۰.۴ - ۰.۳ گرم در روز) تولید می‌شود. اکثر محققان توافق نظر دارند که دوز مصرفی مناسب HMB، ۳ گرم در روز می‌باشد. اگرچه HMB به صورت اندوژن از لوسین سنتز می‌شود اما روزانه مصرف ۶۰ گرم لوسین برای

1. Warren
2. Sumann
3. Van Kovering
4. Wilson

تامین دوز ۳ گرم در روز ضروری است (ویلسون<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۸). برای کسب ۶۰ گرم لوسین از رژیم غذایی، باید حداقل روزانه ۶۰۰ گرم پروتئین از منابع غذایی غنی از لوسین مصرف گردد. مسلماً این امر عملی نمی‌شود. بنابراین برای کسب دوز مناسب HMB، مصرف مکمل ضروری است. زمانی که این مکمل مصرف می‌شود، HMB در گردش خون پس از یک الی دو ساعت به اوج می‌رسد و پس از نه ساعت به سطح پایه برمی‌گردد (ویلسون و همکاران، ۲۰۰۸).

همچنین، مصرف HMB بعنوان بهبود عملکرد عضلانی در موش‌های دچار دیستروفی دوشن عضلانی (که درجه‌ی زیادی از انحطاط و بازسازی عضلانی را داراست) گزارش شده است (کریدر<sup>۲</sup>، ۲۰۰۰). بعلاوه، نشان داده شده است که HMB-fa باعث کاهش آتروفی فیبر و آسیب در اندام بی‌تحرك موش‌های بالغ می‌شود (نوزاکا<sup>۳</sup>، ۲۰۰۶). HMB با فسفریلاسیون بیشتر AKT (هواتسون<sup>۴</sup>، ۲۰۰۸)، و بهبود سیگنال‌های آنابولیک از طریق مسیر m-TOR، بعنوان کاهش آتروفی عضلانی و افزایش هایپرتروفی عضلانی، گزارش شده است (برگر<sup>۵</sup>، ۲۰۰۸). با این حال، علی‌رغم کمبود مطالعات قابل قبول، اثر HMB-FA بر کاهش آپوپتوزیس در میوبلاست انسانی تحت شرایط گرسنگی یا ناشی از آپوپتوزیس استاروسپورین مشاهده شده است (هواتسون<sup>۶</sup>، ۲۰۰۹). مصرف مکمل HMB برای ورزشکاران حرفه‌ای و غیر حرفه‌ای دارای مزایای بیشماری است. مطالعات محققین دانشگاه Wichita state نشان داده است که این مکمل طی یک دوره تمرین، موجب افزایش سطح اکسیژن مصرفی بیشینه به میزان ۴٪ شده است. همچنین مطالعات بسیاری نشان می‌دهد که با مصرف مکمل HMB اکسیداسیون چربی در سلول‌های ماهیچه‌ای افزایش می‌یابد و موجب کاهش body fat و کاهش کلسترول خون و کاهش پروتئولیز ماهیچه‌ای می‌گردد. با وجود این مزایا و با توجه به این نکته که تا کنون اثرات زیان بار جانبی برای این مکمل گزارش نشده است، تحقیقات در رابطه با تاثیر این مکمل بر دیگر عوامل تاثیر گذار بر ورزش مانند فاکتورهای پیش التهابی اینترلوکین ۶ و TNF- $\alpha$  می‌تواند بسیار مفید واقع گردد (ویلسون<sup>۷</sup>، ۲۰۱۳).

نکته حائز اهمیت در ارتباط با مصرف HMB آن است که تأثیرگذاری و سازگاری آن در افراد تمرین کرده نسبت به تمرین نکرده با سرعت کمتری رخ می‌دهد به همین دلیل سودمندترین بازه استفاده برای HMB در افراد تمرین کرده، بازه‌هایی با مدت بالا خواهد بود. (دورکالک<sup>۸</sup>، ۲۰۱۵). صرف این

1. Wilson, et al.
2. Kreider
3. Nosaka
4. Howatson
5. Burger
6. Howatson
7. Wilson
8. Durkalec

ماده هیچ گونه عوارض جانبی و زیان آور ندارد و برای آن هیچ رکوردی ثبت نشده است برای مثال مشاهدات مواد به عملکرد کلیوی کبدی و خونی بعد از مصرف ۲ گرم از این ماده هیچ گونه رکورد منفی را از خود ثبت نکرد (آلبرت<sup>۱</sup>، سانچز، ۲۰۱۵).

نتایج برخی از تحقیقات نشان داد که تمرینات مقاومتی به همراه مکمل یاری HMB باعث کاهش کلسترول تام (CT) (LDL) (لیپوپروتئین با دانسیته پایین) و تری گلیسیرید (TG) افزایش قابل توجه در سطح HDL لیپوپروتئین با دانسیته بالا و همچنین قدرت بیشینه شد (اراضی، روحانی، قیاسی، داوران، ۲۰۱۷).

اما برخی دیگر از مطالعات در تناقض با این نتایج افزایش در سطح تری گلیسیرید، اسید چرب اشباع و غیراشباع یگانه و چندگانه همچنین امگا ۳ و ۶ و کاهش در متغیر قدرت را نشان داده اند (اراضی<sup>۲</sup>، روحانی، قیاسی، داوران، ۲۰۱۷).

در برخی دیگر از تحقیقات هیچ تغییر معنی داری در سطوح متغیر کلسترول و HDL و LDL و تری گلیسیرید و متغیر قدرت و ترکیب بدن (توده چربی و بدون چربی) (دراثر تمرین مقاومتی به همراه مکمل یاری HMB دیده نشده است (تینسلی<sup>۳</sup>، مور، گری بیل، ۲۰۱۹).

درباره مصرف مکمل HMB مطالعات متعددی وجود دارد که نتایج ضد و نقیضی را به همراه داشته است. به همین منظور برای روشن تر شدن چگونگی مصرف این مکمل و نحوه ی تاثیر آن بر شاخص های آپوپتوزیس سلولی، به مطالعات و تحقیقات بیشتری نیاز دارد. HMB-Ca معمولاً به صورت آهسته جذب می شود و تقریباً ۶۰ تا ۱۲۰ دقیقه زمان لازم است تا به اوج غلظت پلاسمایی خود برسد (فولر<sup>۴</sup>، ۲۰۱۱). در مقابل، وقتی HMB با اسید آزاد به صورت HMB-FA مصرف شود میزان جذب آن سریع تر شده و تقریباً ۳۰ دقیقه بعد از مصرف به اوج غلظت پلاسمایی خود می رسد (فولر، ۲۰۱۱). میزان جذب و غلظت بیشتر باعث افزایش فراهمی زیستی HMB می گردد، در نتیجه به طور بالقوه در افزایش ریکاوری در فعالیتهای با شدت بالا مؤثرتر خواهد بود (ویلکینسون<sup>۵</sup>، ۲۰۱۳).

آپوپتوز فرآیند تنظیم شده و پویایی است که برای نمو جنین، تنظیم دستگاه ایمنی، آتروفی وابسته به هورمون، مرگ سلولی ناشی از مواد شیمیایی و هومئوستاز بافتی ضروری است (کوهن<sup>۶</sup> و همکاران، ۱۹۹۷). آپوپتوز هم چنین می تواند توسط تعدادی از محرک های زیان آور یا استرس زا شامل ضایعات

1. Albert, Sánchez
2. Arazi, Rohani , Ghiasi, Davaran
3. Tinsley, Moor, Graybeal
4. Fuller
5. Wilkinson
6. Cohen, et al.

DNA، گرما، تحریک هورمونی، داروهای ضد سرطان و استرس فیزیکی (جسمانی) ایجاد شود. از آنجایی که آپوپتوز مواد داخل سلولی را به فضای خارج سلولی آزاد نمی سازد، از این رو معمولاً به واکنش التهابی منجر نمی شود. آپوپتوز، فرآیند فعالی است که نیازمند درگیری سلول در حال مرگ و تغییرات بیوشیمیایی و بافت شناختی سلولی است که به گسستگی DNA، قطعه قطعه شدن و تراکم هسته‌ای و تغییرات توزیع چربی غشایی منجر می‌شود (بیدر و سنیک، ۲۰۰۱). سلول‌های آپوپتوزی به سرعت به وسیله ی سلول‌های سالم مجاور، آندوسیتوز شده و یا توسط بیگانه خوارهای حرفه‌ای بیگانه خواری می‌شوند. این بیگانه خوارها، در سطح سلول‌های معیوب، پیام‌های بقایای فسفاتیدیل سرین که از میان غشای پلاسمائی عبور کی کنند را، تشخیص می‌دهند. آپوپتوز، منجر به قطعه قطعه شدن غیر قابل برگشت و اینترنوکلیوزومال DNA ژنومی و قطعه قطعه شدن سلول به اجسام آپوپتوزی متصل به غشا می‌شود (لوز<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۱). مراحل پیچیده و متوالی آپوپتوز شامل مرحله ی تأثیر گذار، کاسپازهای سلولی و اندونوکلازها فعال می‌شوند و تنظیمات میتوکندریایی مختل می‌گردد (سالوسن و دیگریت، ۱۹۹۹). در نقطه ی بدون بازگشت، سلول‌ها محکوم به مرگ هستند و سازمان دهی مجدد اسکلت سلولی و تفکیک کروماتین هسته ای، نشانه مرحله ی تخریب ( تجزیه) است. سرانجام، از بین بردن سلول‌های آپوپتوزی توسط ماکروفاژها و دیگر سلول ها، به عنوان بخشی از فاز تصفیه اتفاق می‌افتد (ایگنر<sup>۲</sup>، ۲۰۰۲).

آزمایش‌های بسیاری نقش مهم آپوپتوز را در تحلیل و سارکوپنی عضله نشان داده‌اند (کونولی<sup>۳</sup>، ۲۰۰۳)، (جیانگ<sup>۴</sup>، ۱۹۹۹)، (موتوح<sup>۵</sup>، ۱۹۹۹)، (لاکا<sup>۶</sup>، ۲۰۰۷)، (کوک ترک<sup>۷</sup>، ۲۰۰۸)، (نیرتر<sup>۸</sup>، ۲۰۰۰)، (نلو<sup>۹</sup> و نونان<sup>۱۰</sup>، ۲۰۱۰). اگرچه، آپوپتوز عضله اسکلتی منحصراً با مرگ سلولی متفاوت است. بیشترین اهمیت در این است که، عضله ی اسکلتی چند هسته‌ای است بنابراین از بین بردن یک هسته عضله توسط آپوپتوز باعث ایجاد مرگ سلولی گسترده و وسیع نمی شود. با این وجود، حذف یک هسته ی عضله منجر به فقدان بیان ژن در محدوده ی سیتوپلاسمی که توسط هسته ی عضله تحت کنترل بوده، می‌شود. این فقدان کنترل ژنی نمی تواند کاملاً توسط هسته سلول عضلانی پنداشته شود، و بعد از آستانه ی فقدان هسته، فیبر عضلانی تحلیل می‌رود (فو<sup>۱</sup>، ۲۰۰۹)، (مرلینی<sup>۱</sup>، ۲۰۰۵).

1. Los, et al.
2. Aigner
3. Connolly
4. Jiang
5. Mutoh
6. Lakka
7. kocturk
8. Knitter
9. Nelo& Nunan
10. Fu

با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر مکمل HMB بر آپوپتوز و فاکتورهای همچون کاسپاز ۳ و ۸، این مکمل می تواند بر فاکتورهای آپوپتوز سلولی تاثیرگذار بوده و آنها را مهار گرداند اما مطالعه ای در زمینه تاثیر HMB بر آپوپتوز سلولی به همراه فعالیت مقاومتی برون گرا در دسترس نیست. به همین دلیل این پژوهش با این هدف انجام می شود که تاثیر تعاملی مصرف HMB-FA و فعالیت ورزشی مقاومتی برون گرا بر آپوپتوز را مورد مطالعه قرار دهد.

### روش شناسی پژوهش

پژوهش حاضر از لحاظ هدف کاربردی است. پژوهش حاضر از نوع نیمه تجربی و براساس میزان نظارت و درجه کنترل، از نوع پژوهش های آزمایشگاهی است و اثر هم زمان مصرف مکمل HMB-FA و فعالیت ورزشی مقاومتی برون گرا بر آپوپتوز سلولی مورد مطالعه قرار می گیرد. برای انجام تحقیق بعد از تهیه وسایل و آماده سازی مقدمات آزمایش، ابتدا مطالعه پیش آزمون (Pilot study) انجام گرفت و به دنبال کسب نتایج اولیه و بررسی آنها و با بر طرف کردن نقایص موجود آزمایش های اصلی پی گیری شد.

جامعه تحقیق شامل رتهای نر مورد مطالعه از نژاد اسپراگ داوولی بودند که در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله نگهداری می شدند. نمونه آماری شامل بیست چهار راس رت با سن هشت هفته ای و با وزن  $200 \pm 20$  گرم بطور تصادفی برگزیده شدند.

موش ها در اتاقی با تنظیم خودکار دما و روشنایی استاندارد نگهداری شدند. از نظر دسترسی به آب و غذا در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با متوسط درجه حرارت  $23 \pm 2^\circ C$  و رطوبت ۴۰-۶۰٪ در قفس های فایبرگلاس به صورت دوتایی نگهداری می شدند. برای نگهداری و کار با حیوانات همه ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. آب و غذای حیوانات در طول دوره کار تامین شد. محل نگهداری آنها پیوسته تمیز شده و دما و رطوبت هوا و هم چنین سیکل شبانه روزی (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی) کنترل گردید.

مصرف غذای روزانه و وزن بدن رت ها هر شش روز اندازه گیری می شد. اندازه گیری وزن رت ها روی ترازو در روز اول شروع مطالعه و در انتها اندازه گیری و ثبت شد.

### پروتکل تمرینی

رت ها به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: (۱) گروه کنترل ( $n=6$ )، (۲) HMB ( $n=6$ )، (۳) ورزش ( $n=6$ )، (۴) ورزش و HMB ( $n=6$ ). رت های پروتکل تمرینی با نظر چندتن از اساتید برجسته فیزیولوژی ورزش ایران بررسی و نمره آن ۰/۸۱ اعلام شد.

ابتدا گروه‌های تجربی سه جلسه آشناسازی را با پایین آمدن از نردبان و به دست آوردن 1RM را انجام دادند. برای بدست آوردن 1RM رت‌ها، ابتدا وزنه‌ای برابر با ۵۵٪ وزن بدنشان به دم آنها بسته شد. در صورت اجرای موفق بالا رفتن از نردبان، به مقدار وزنه افزوده شد. در صورت اجرای موفق بالا رفتن در هر تکرار ۳۵ گرم به وزنه‌ها افزوده می‌شد تا زمانی که به واماندگی برسند و توانایی بالا رفتن از نردبان را نداشته باشند. مقدار وزنه قبل از واماندگی به عنوان 1RM در نظر گرفته شد. استراحت بین تکرارها ۲ دقیقه بود. دستگاه نردبان به ارتفاع یک متر و شیب قابل تنظیم بود. بین نرده‌ها یک سانتی متر فاصله بود.

پس از مرحله آشنا سازی، دو هفته بارگیری مکمل مورد نظر بصورت روزانه اجرا شد. در گروه‌های تجربی، ۲۵۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن در هر روز در نظر گرفته شد. مکمل در یک میلی لیتر آب مقطر محلول و به صورت گاواژ به رت‌ها خوراندند شد. استراحت بین تکرارها ۲ دقیقه بود.

پس از دوره بارگیری مکمل، یک جلسه فعالیت مقاومتی برون گرا اجرا شد. فعالیت ورزشی برون‌گرای شدید بصورت پایین آمدن از نردبان با شیب ۸۰٪ با بستن وزنه‌ای معادل ۱۲۰٪ 1RM به پشت دم رت‌ها اجرا شد. هر رت توسط آزمون‌گر در بالای نردبان قرار می‌گرفت و رت می‌باید هشت بار از نردبان در هر ست پایین می‌آمد. در صورتی که سه ست را اجرا می‌کرد پروتکل تمام می‌شد. در صورتی که قبل از اجرای سه ست به واماندگی می‌رسید و حتی پس از سه بار شوک دادن توان پروتکل را نداشت، اتمام پروتکل محسوب می‌شد. هر رت ۲ دقیقه بین تکرارها استراحت می‌کرد.

رت‌ها پس از اجرای پروتکل تمرینی کشته شدند و عملیات بافت برداری برای استخراج RNA انجام شد.

### سنجش میزان بیان ژن

بیان گیرنده کاسپاز ۳ و ۸ با اندازه‌گیری میزان mRNA این ژن توسط تکنیک نیمه کمی Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) تعیین شد. کل RNA موجود در ۵۰ mg از بافت شریانی با استفاده از کیت استخراج RNA (Topagene kavosh, Iran) با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده جدا شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از نمونه در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. ۳ میکرولیتر از RNA هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA (Bioneer) به cDNA<sup>1</sup> ترجمه شد. ۲ میکرولیتر از cDNA توسط کیت PCR (Bioneer) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده چندین برابر شد. بیان ژن  $\beta$  - اکتین به عنوان معیار مقایسه میزان بیان ژن استفاده شد.

پرایمر طراحی شده برای گیرنده کاسپاز ۸

Forward: GATGACTTGAGCCTGCTTGA

Reverse: CGAGGTTTGTTCCTTCATTTGGT

پرایمر طراحی شده برای کاسپاز ۳

Forward: GACCATACATGGGAGCAAGT

Reverse: CCTTCATCACCATGGCTTAGA

این پرایمرها با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی شده بود. نمونه‌های PCR روی ژل آگاروز ۱٪/۵ با استفاده از ethidium bromide مشاهده شد. با استفاده از Gel Doc تصویر گرفته شد.

برای تفسیر و بررسی نتایج نرم افزار آماری Spss-20 بکار رفت.

#### یافته‌ها

مشخصه‌های توصیفی چهار گروه در جدول (۱) ارائه شده است. شاخص اندازه‌گیری کاسپاز تعداد نیمه کمی کپی نامبر های mRNA موجود در بافت نسبت به بتا اکتین که یک housekeeping gene می‌باشد، است.

جدول ۱: توصیف ویژگی‌های آزمودنی‌ها

| شاخص     | گروه        | میانگین و انحراف استاندارد آزمون |
|----------|-------------|----------------------------------|
| کاسپاز ۳ | کنترل       | $0.024 \pm 0.019$                |
|          | ورزش        | $1.666 \pm 1.24$                 |
|          | مکمل و ورزش | $0.0 \pm 0.0$                    |
|          | مکمل        | $0.193 \pm 0.136$                |
| کاسپاز ۸ | کنترل       | $0.064 \pm 0.0580$               |
|          | ورزش        | $1.522 \pm 0.789$                |
|          | مکمل و ورزش | $0.0 \pm 0.0$                    |
|          | مکمل        | $0.339 \pm 0.239$                |

جهت بررسی توزیع طبیعی داده‌های آزمون از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. نتایج نشان داد سطح معنی داری مشخص شده که داده‌های آزمون در همه شاخص‌ها از توزیع طبیعی برخوردار نیستند

جدول ۲: نتایج آزمون من ویتنی جهت مقایسه گروه تجربی و کنترل

| شاخص     | گروه  | تعداد | میانگین رتبه | جمع رتبه | مقدار Z | سطح معنی داری |
|----------|-------|-------|--------------|----------|---------|---------------|
| کاسپاز ۳ | کنترل | ۴     | ۶.۱۶۶        | ۱۸.۵     | ۱.۹۵۲-  | ۰.۱۴۲         |
|          | ورزش  | ۵     | ۳.۵          | ۱۷.۵     |         |               |
| کاسپاز ۸ | کنترل | ۴     | ۶.۱۶۶        | ۱۸.۵     | ۱.۹۵۲-  | ۰.۱۴۲         |
|          | ورزش  | ۵     | ۳.۵          | ۱۷.۵     |         |               |

با توجه به میزان سطح معنی داری مشخص شد که فعالیت ورزشی مقاومتی برون‌گرا بر کاهش شاخص کاسپاز ۳ و ۸ تاثیر معنی‌داری ندارد. (جدول ۲).

جدول ۳: نتایج آزمون من ویتنی جهت مقایسه گروه تجربی و کنترل

| شاخص     | گروه  | تعداد | میانگین رتبه | جمع رتبه | مقدار Z | سطح معنی داری |
|----------|-------|-------|--------------|----------|---------|---------------|
| کاسپاز ۳ | کنترل | ۴     | ۲.۸۳۳        | ۸.۵      | ۰.۲۹۶-  | ۰.۸ ❖         |
|          | مکمل  | ۴     | ۳.۲۵         | ۶.۵      |         |               |
| کاسپاز ۸ | کنترل | ۴     | ۲.۸۳۳        | ۸.۵      | ۰.۲۹۶-  | ۰.۸           |
|          | مکمل  | ۴     | ۳.۲۵         | ۶.۵      |         |               |

با توجه به میزان سطح معنی داری مشخص شد که مصرف مکمل HMB-FA تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های کاسپاز ۳ و ۸ ندارد. (جدول ۳).

جدول ۴: نتایج آزمون من ویتنی جهت مقایسه گروه تجربی و کنترل

| شاخص     | گروه               | تعداد | میانگین رتبه | جمع رتبه | مقدار Z | سطح معنی داری |
|----------|--------------------|-------|--------------|----------|---------|---------------|
| کاسپاز ۳ | کنترل              | ۴     | ۳.۶۶         | ۱۱.۰     | ۱.۰۵۰-  | ۰.۳۸          |
|          | مکمل به همراه ورزش | ۶     | ۵.۶۶         | ۳۴.۰     |         |               |
| کاسپاز ۸ | کنترل              | ۴     | ۴.۵          | ۱۳.۵     | -۰.۴۰۴  | ۰.۷۱          |
|          | مکمل به همراه ورزش | ۶     | ۵.۲۵         | ۳۱.۵     |         |               |

با توجه به میزان سطح معنی داری مشخص شد که مصرف مکمل HMB-FA به همراه ورزش مقاومتی برون گرا تأثیر معنی داری بر متغیرهای مورد مطالعه ندارد. (جدول ۴).

جدول ۵: نتایج آنالیز آزمون کروسکال والیس درمتغیرهای گروه ها

| شاخص     | گروه        | تعداد | میانگین رتبه | سطح معنی داری |
|----------|-------------|-------|--------------|---------------|
| کاسپاز ۳ | کنترل       | ۴     | ۸.۶۶         | ۰.۱۳۲         |
|          | ورزش        | ۵     | ۱۱.۱۶        |               |
|          | مکمل و ورزش | ۶     | ۵.۰          |               |
|          | مکمل        | ۴     | ۹.۰          |               |
| کاسپاز ۸ | کنترل       | ۴     | ۹.۵          | ۰.۲۷۷         |
|          | ورزش        | ۵     | ۱۰.۰۸        |               |
|          | مکمل و ورزش | ۶     | ۵.۵          |               |
|          | مکمل        | ۴     | ۹.۷۵         |               |

نتایج آزمون کروسکال والیس نشان داد که بین چهار گروه مورد بررسی در شاخص کاسپاز ۳ و ۸ تفاوت معنی داری وجود نداشت. (جدول ۵).

### بحث و نتیجه گیری

هدف از این مطالعه تعیین تاثیر تعاملی مصرف HMB-free acid و فعالیت مقاومتی برون گرا بر آپوپتوز سلولی در رت‌های بالغ نر می باشد. نتایج نشان داد در نمرات شاخص کاسپاز ۳ و ۸ گروه فعالیت ورزشی مقاومتی برونگرا تفاوت معنی دار نبود. همچنین در نمرات گروه مکمل در شاخص کاسپاز ۳ و ۸ تفاوت معنی دار نبود. نتایج نشان داد نمرات گروه مکمل HMB-FA و فعالیت ورزشی مقاومتی برونگرا در شاخص کاسپاز ۳ و ۸ معنی دار نبود. در چهار گروه پژوهش در شاخص کاسپاز ۳ و ۸ تفاوت معنی دار نبود.

انقباض برونگرا ژن p53 حساس به استرس را تنظیم افزایشی نموده و بازسازی مسیرهای آپوپتوز را بهبود می بخشد (چن و همکاران). ورزش برونگرا سبب فعال شدن ژن‌هایی می شود که سنتز غشایی را بهبود می دهند (ماهونی). هموستاز کلسیم درون سلولی در رت‌های ماده به دنبال فعالیت برونگرا باقی می ماند اما در نقطه مقابل در رت‌های نر اینگونه نیست. همچنین درمورد مکمل HMB بیان کردیم که مصرف این مکمل موجب کاهش پروتئولیز عضلانی می شود. HMB دارای خاصیت آنتی کاتابولیسمی می باشد و می تواند از طریق ممانعت از فعالیت‌های پروتئولیزی ماهیچه مانع از دست رفتن نیتروژن گردد. فلذا منجر به ترمیم سریع تر ماهیچه می گردد. چنانچه نشان داده شده است مکمل سازی HMB با مقدار ۱/۵ تا ۳ گرم در روز تجزیه پروتئین عضله را کاهش می دهد و به همراه آن قدرت و توده عضلانی را پس از تمرینات مقاومتی که بین ۳ تا ۸ هفته انجام شده اند افزایش می دهد.

همچنین با بررسی مطالعات پیشین دریافتیم که HMB عفونت ناشی از کاسپاز ۳ و فعال سازی PKR را مسدود می کند (سوپینسکی ۲۰۱۴). HMB بر افزایش تجزیه پروتئین و کاهش سنتز پروتئین ناشی از دگزامتازون تاثیر مهاری دارد (آوارسا ۲۰۱۲). فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در گروه‌های تحت درمان با HMB کاهش یافت (جکسون ۲۰۱۱). HMB تجزیه ی پروتئین از طریق LPS را کاهش می دهد (راسل ۲۰۰۹).  $\text{TNF-}\alpha$  و آنژیوتنسین II تجزیه پروتئین عضلات را از یک مسیر منظم افزایش می دهند که توسط HMB تضعیف می شود (الی ۲۰۰۸). در پژوهش حاضر دریافتیم که نمرات گروه مکمل به همراه ورزش در شاخص کاسپاز ۳ و ۸ تفاوت معنی دار نبود. با توجه به اثرات فیزیولوژیک مکمل HMB و فعالیت برونگرا و همچنین مطالعات پیشین این یافته با پژوهش‌های پیشین ناهمسو می باشد. که می توان علت آن را تعداد کم نمونه‌ها دانست چرا که سطوح شاخص‌های مورد مطالعه کاهش داشته اند اما این کاهش‌ها معنی دار نبوده است. در دیگر یافته‌ها تاثیر هر یک از فعالیت مقاومتی برونگرا و مکمل

HMB به تنهایی بر متغیرهای مورد مطالعه معنی‌دار نبود که با نتایج مطالعات پیشین ناهمسو می‌باشد و ممکن است به دلیل پروتکل تمرینی مورد استفاده که برای اولین بار در جهان از این شیوه در این پژوهش استفاده شده است باشد.

### نتیجه گیری

مکمل گیری HMB-FA و تمرینات مقاومتی برون‌گرا در این پژوهش هرچند که باعث کاهش شاخص کاسپاز ۳ و ۸ شد اما تاثیر معنی‌داری بر آن‌ها نداشت.

با توجه به نتایج مصرف مکمل HMB-FA و تمرین مقاومتی برون‌گرا نمی‌تواند از آپوپتوز سلولی جلوگیری کند اما می‌تواند باعث کاهش سطوح کاسپاز ۳ و ۸ گردد. پیشنهاد می‌شود اثر مصرف HMB-FA همراه با مکمل لوسین و انقباضهای برون‌گرا و درون گرا روی ترکیب بدنی به ویژه توده عضلانی انسان انجام شود.

### منابع

Albert FJ, Morente-Sánchez J, Ortega Porcel FB, Castillo Garzón MJ, Gutiérrez Á. (2015) Usefulness of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl butyrate (HMB) supplementation in different sports: an update and practical implications. *Nutr Hosp*;32:20-33.

Arazi H, Rohani H, Ghiasi A, Davaran M. The Effect of HMB Supplementation on Cardiovascular Risk Factors after Four Weeks of Resistance Training in Amateur Athletes (2017). *Int Cardio Res J*; 9:e11400.

Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A, (2012) Metabolic markers in sports medicine. *Advances in clinical chemistry*;56:2.

Dehkhoda.M.N.M. (1383). Supplements and doping in sport.

DG., A (2001). Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol Scand*, 171:311-319.

Durkalec-Michalski K, Jeszka J. (2015) The efficacy of a  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl butyrate supplementation on physical capacity, body composition and biochemical markers in elite rowers: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study. *J Int Soc Sports Nutr*

Evans W, Meredith C, Cannon JG, Dinarello C, Frontera W, Hughes V, et al(1986). Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. *Journal of Applied Physiology*.;61(5):1864-8.

Fielding RA, Meredith CN, O'Reilly KP, Frontera WR, Cannon JG, Evans WJ.( 1991) Enhanced protein breakdown after eccentric exercise in young and older men. *Journal of applied Physiology*;71(2):674-9.

Ghanbari A, T. M .(1389) .Effect of eccentric resistance training on blood coagulation factors on inactive male students .*Blood Journal* , (8)3 :195-206 . Persian

Hider RC, F. E .(1960). Relationship between intracellular amino acids and protein synthesis in the extensor digitorum on gusmuycle of rats.(2)114:171-178.

Howatson G, V. S .(2008). Prevention and Treatment of Exercise Induced Muscle Damage .*Sports Med* ,(6)38 :483-503.

Hyldahl RD, Hubal MJ. (2014) Lengthening our perspective: morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. *Muscle & nerve*.;49(2):155-70.

Leeder J, Gissane C, van Someren K, Gregson W, Howatson G. (2012) Cold water immersion and recovery from strenuous exercise: a meta-analysis. *Br J Sports Med*.;46(4):233-40.

Luttrell MJ, Halliwill JR.( 2015) Recovery from exercise: vulnerable state, window of opportunity, or crystal ball? *Frontiers in physiology*.;6:204.

Mujika I. (1998) The influence of training characteristics and tapering on the adaptation in highly trained individuals: a review. *International journal of sports medicine*. 19(07):439-46.

Murray A, Cardinale M. (2015) Cold applications for recovery in adolescent athletes: a systematic review and meta-analysis. *Extreme physiology & medicine*.;4(1):17.

Nicholas Ratamess, T. B .(2014). *ACSM's foundations for strength training and conditioning* .Tehran: phazhoheshgah.

Sumann G, F. D .(2007). Blood coagulation activation and fibrinolysis during a downhill marathon run .*Blood Coagula Fibrinolysis* ,(5)18 :435-40.

Tinsley GM, Moore ML, Graybeal AJ, Paoli A, Kim Y, Gonzales JU, Harry JR, VanDusseldorp TA, Kennedy DN, Cruz MR.(2019) Time-restricted feeding plus resistance training in active females: *a randomized trial. Am J Clin Nutr*;110:628-40.

TJ., K .. (2010). Effects OF leucine supplementation on indices of muscle damage and recovery following eccentric based resistance exercise . *Submitted to the Graduate School Appalachian State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Department of Health, Leisure, and Exercise Science.*

Uttrell MJ, Halliwill JR. (2015) Recovery from exercise: vulnerable state, window of opportunity, or crystal ball? *Frontiers in physiology*;6:204.

Van Kovering, N. S .(1992). Oxidation of leucine and alpha ketoisocaproate to HMB in vivo .(27):262.

Waldron J.E, P. G.(2002). Concurrent creatine monohydrate supplementation and resistance training does not affect markers of hepatic function in trained weightlifters .*JEP*, 5:57-64

Warren GL, I. C ..(2002). What mechanisms contribute to the strength loss that occurs during and in the recovery from skeletal muscle injury ?*J Orthop Sports Phys Ther*, 32(2):58-64.

White GE, Wells GD.(2013). Cold-water immersion and other forms of cryotherapy: physiological changes potentially affect recovery from high-intensity exercise. *Extreme physiology & medicine*.;2(1):26.

Wilson J, W. G..(2006). Contemporary issues in protein requirements and consumption for resistance trained athletes.3: 7-27.

Wilson JM, F. P .(2013). International Society of Sports Nutrition Position Stand: beta hydroxy-beta-methyl butyrate (HMB) .