Archive of SID

نشریه مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش مقاله پژوهشی
دوره ۲، شماره ۳، بهار و تابستان ۱۳۹۳ تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۰۳

تاثیر تمرین استقامتی شنا و مکمل سیلیمارین در طی بارداری بر شاخص آپوپتوزی سلول های کبد نوزادان موش‌های صحرایی ناشی از مسمومیت مادری با کادمیوم

شادمهر میردار هریجانی[۱]، حسین علی اصغرزاده اولیایی[۲]
غلامرضا حمیدیان[۳]، نرگس موسوی[۴]

چکیده

زمینه و هدف: در طی رشد جنین، هم تکثیر سلولی و هم آپوپتوز برای رشد صحیح بافت کبد جنین ضروری است. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر یک دوره برنامه تمرین استقامتی شنا و مکمل سیلیمارین در طی بارداری بر شاخص آپوپتوزی سلول های کبد نوزادان موش‌های صحرایی در معرض مسمومیت با کادمیوم انجام گرفت.

روش تحقیق: ۷۲ سر موش صحرایی باردار نژاد ویستار (وزن ۲۰ ± ۲۰۰ گرم) به ۹ گروه تقسیم شدند. کادمیوم کلراید به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت محلول در آب آشامیدنی به موش‌ها خورانده شد. برنامه تمرینی در دوران بارداری ۶۰ دقیقه شنا در روز و به مدت ۵ روز در هفته بود. سیلیمارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت زیرجلدی ۳ بار در هفته تزریق شد. نمونه برداری از بافت کبد دو روز پس از تولد انجام شد و برای تعیین شاخص آپوپتوزی کبد از تکنیک ایمونوهیستوشیمی تانل به روش غیر رادیواکتیو نشاندار کردن انتهایی در جای خود، استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل یافته‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی LSD در سطح خطای $\alpha \leq ۰/۰۵$ بهره برداری گردید. **یافته‌ها:** شاخص آپوپتوزی کبد در گروه های کادمیوم ـ سیلیمارین و کادمیوم ـ تمرین ـ سیلیمارین در مقایسه با گروه کادمیوم، کاهش معنی داری ($p<۰/۰۰۱$) نشان داد؛ اما تمرین شنا به تنهایی تاثیری بر شاخص آپوپتوزی کبد نداشت ($p=۰/۸۳$). نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی شنا در طی بارداری تاثیری بر کاهش شاخص آپوپتوزی سلول های کبد نوزادان ناشی از مسمومیت مادری با کادمیوم ندارد، اما تزریق سیلیمارین به طور احتمالی آن را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: کادمیوم، تمرین شنا، سیلیمارین، شاخص آپوپتوزی، کبد نوزاد.

۱. نویسنده مسئول، دانشیار فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران؛
آدرس: دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، پست الکترونیک: shadmehr.mirdar@gmail.com.
۲. کارشناس ارشد تربیت بدنی، دبیرستان شهید مطهری، اداره آموزش و پرورش شهرستان بابل، بابل، ایران.
۳. استادیار بافت شناسی گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۴. کارشناس ارشد تربیت بدنی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کادمیوم[1] یکی از آلاینده‌های صنعتی و یک فلز سمی سنگین است که به مسمومیت ریه، کبد، کلیه، استخوان منجر شده و موجب مرگ سلولی و نقص عملکرد این بافت ها می گردد (۳، ۴، ۳۳). قرارگرفتن در معرض کادمیوم در دوران بارداری از جذب و انتقال عناصر ضروری از جفت به جنین جلوگیری می‌کند و احتمالا با کاهش غلظت روی، آهن و مس در کبد جنین و غلظت کلسیم در جفت، بر متابولیسم و رشد جنین اثر می‌گذارد (۱۵). پژوهش بر روی انسان نشان داده است که تجمع کادمیوم در جفت مادران سیگاری در طی سه ماهه اول دوره بارداری شروع می‌شود. در دوران بارداری، کادمیوم کبدی فراخوانی شده و از طریق پلاسمای خون به کلیه و جفت منتقل می‌شود و احتمالاً غلظت کادمیوم را در خون افزایش می‌دهد (۱۱) برخی پژوهش‌ها کاهش وزن بدن و کبد جنین و کاهش تعداد جنین‌ها را در اثر آلودگی با کادمیوم گزارش کرده‌اند (۱۵). منابع اولیه آلودگی با کادمیوم در انسان، غذا و مصرف سیگار می‌باشد (۲۸). متوسط غلظت کادمیوم برنج خام در شمال ایران ۰/۳۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (۲). قرارگیری دراز مدت در معرض کادمیوم منجر به دو شکل متفاوت مرگ سلولی، یعنی آپوپتوزی[2] و نکروزی[3] می‌شود (۱۷). آپوپتوزیس نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که طی آن، سلول‌های ناخواسته یا آسیب دیده در طی رشد و هموستاز بافت‌ها و اندام‌های مختلف، حذف می‌شوند (۲۵). رژیم غذایی، فعالیت ورزشی شدید، و قرارگیری دراز مدت در معرض مواد شیمیایی در هنگام بارداری، استرس اکسایشی را افزایش می‌دهند (۲۴). از سوی دیگر، بر اساس نتایج حکاک دخت و همکاران (۲۰۱۱) انجام تمرینات هوازی منظم در دوران بارداری، افزایش فعالیت سیستم ضد اکسایشی بدن را در پی دارد (۹). به علاوه، مولکول‌های ضد آپوپتوزی مختلف با تمرینات ورزشی افزایش پیدا می‌کنند و پس از بی‌تمرینی در سطوح بالایی باقی می‌مانند (۲۹).

در مورد تاثیر فعالیت‌های ورزشی بر آپوپتوزیس ناشی از کادمیوم، پژوهشی یافت نشده است؛ اما در پژوهشی مشابه، میلنروویچ[4] و همکاران (۲۰۰۴) با اندازه‌گیری غلظت کادمیوم خون و ادرار، اثرات دوی استقامت با شدت متوسط را بر میزان دفع کادمیوم از بدن افراد سیگاری مثبت ارزیابی کردند (۲۰). از سوی دیگر، امروزه سیلیمارین[5] به دلیل توانایی در مقابله با سیگنال‌های آپوپتوزی، به عنوان یک ضد اکسایش مطرح شده است. گزارش شده است سیلیمارین از یکپارچگی ژنوم محافظت کرده و با مرگ سلولی آپوپتوزی و نکروزی مقابله می‌کند (۲۳). در همین راستا، آشتیانی و همکاران (۱۳۸۹) در پژوهشی گزارش کرده اند که تیمار سلول ها با سیلیمارین در مدت زمان مشخص، می‌تواند با افزایش میزان بقای سلول‌های بنیادی و همچنین افزایش سرعت رشد، کارآیی این سلول‌ها را در حیطه بالینی افزایش دهد (۱). با توجه به آنچه در بالا ذکر شد و نیز عدم وجود گزارش مستند علمی که به بررسی تاثیر تمرین شنا یا مکمل سیلیمارین بر آپوپتوزیس ناشی از کادمیوم پرداخته باشد، تحقیق حاضر بر آن است تا تاثیر ترکیبی تمرین شنای استقامتی و مکمل ضد اکسایشی سیلیمارین را در کبد نوزادان موش‌های باردار در معرض مسمومیت با کادمیوم بررسی نماید.

روش تحقیق

حیوانات: در این پژوهش، از ۷۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰ ± ۲۰۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به صورت گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای ۲ ± ۲۳ درجه سانتی گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد، و چرخه تاریکی ـ روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طی دوره پژوهش، غذای استاندارد پلت و آب به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. یک هفته پس از انتقال به آزمایشگاه و سازگاری با محیط جدید، جهت آشنایی با آب، کاهش استرس شنا، و سازگاری با شرایط تمرینی، حیوانات به استخر شنا

1. Cadmium
2. Apoptotic
3. Necrotic
4. Milnerowicz
5. Silymarin

www.SID.ir

Archive of SID

منتقل شده و تمرین شنا را به مدت یک هفته انجام دادند. طی این یک هفته، تمرین با ۱۰ دقیقه آغاز و با افزایش ۵ دقیقه تمرین در هر روز، تا پایان هفته به ۳۰ دقیقه رسید. سپس هر دو موش ماده با یک موش نر جهت جفت‌گیری در یک قفس قرار گرفتند و پس از ۴۸ ساعت، با مشاهده پلاک واژنی بر واژینال، روز اول بارداری مشخص شد (۱۴). سپس موش‌ها به ۹ گروه ۸ تایی شامل گروه: ۱. کنترل، ۲. حلال، ۳. کادمیوم، ۴. تمرین، ۵. سیلیمارین، ۶. کادمیوم ـ تمرین، ۷. کادمیوم ـ سیلیمارین، ۸. سیلیمارین ـ تمرین، و ۹. کادمیوم ـ تمرین ـ سیلیمارین، تقسیم شدند.

برنامه تمرینی: موش‌های باردار گروه تمرین یک بار در روز و ۵ روز در هفته در استخر ویژه‌ای به ابعاد ۵۰ ×۵۰ × ۱۰۰ سانتی‌متر (درجه حرارت آب: ۳۰- ۳۵ درجه سانتگراد)، به شنا پرداختند (۲۱). برنامه اصلی تمرین شنا در دوران بارداری با ۳۰ دقیقه آغاز شد و با افزایش ۵ دقیقه در روز، زمان تمرین در هفته دوم به ۶۰ دقیقه رسید. زمان ۶۰ دقیقه تا پایان هفته سوم ثابت بود. اضافه بار تمرینی از طریق تنظیم قدرت و سرعت آب هنگام شنا اعمال گردید؛ به طوری که در هفته سازگاری با تمرین، ثابت ماند و در هفته‌های تمرین در طی دوران بارداری، با ثابت ماندن زمان ۶۰ دقیقه، سرعت و قدرت جریان آب از ۷ به ۱۵ لیتر در دقیقه افزایش یافت (۲۱).

نحوه مصرف کادمیوم: کادمیوم کلراید به صورت محلول به میزان ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در لیتر، از طریق آب آشامیدنی به موش‌ها خورانده شد (۲۱). بر این اساس، میزان ۲ گرم کادمیوم در ۵ لیتر آب کاملاً حل گردید و در ظروف ویژه آب ریخته شد و به صورت ۲۴ ساعته در اختیار موش‌ها قرار گرفت.

نحوه تهیه و تزریق سیلیمارین و حلال سیلیمارین: برای تهیه سیلیمارین، ابتدا ۱/۶ گرم پودر سیلیمارین با ۴ سی سی اتانول مطلق حل شده و سپس با اضافه کردن آب مقطر، به حجم ۱۶ سی سی رسانده شد. دوز سیلیمارین، ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن موش‌های صحرایی بود که هفته‌ای ۳ روز در طول دوران بارداری به صورت زیرپوستی به آن ها تزریق شد (۸). حلال سیلیمارین هم به همان صورت تهیه (۴ سی سی اتانول مطلق + ۱۲ سی سی آب مقطر) و به آزمودنی‌های گروه حلال، تزریق گردید.

تهیه نمونه بافتی: ۲ روز پس از تولد، موش‌های نوزاد با تزریق مخلوط کتامین (۸۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شده، سر آن‌ها با قیچی بریده شد و سپس بافت کبد آن‌ها خارج گردید (۳۲). برای مطالعه ساختار بافت شناسی، نمونه‌های بافت کبد پس از اندازه‌گیری وزن، به منظور تثبیت در محلول فرمالین[1] ۱۰ درصد تثبیت شد. جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی از نمونه‌ها، به روش معمول تهیه مقاطع بافتی، عمل گردید. در این روش پس از تثبیت، با استفاده از دستگاه هیستوکیت[2] مدل ۲۰۰۰ ساخت شرکت لیکا آلمان، مراحل مختلف پاساژ بافتی شامل آب‌گیری (با استفاده از ۷ ظرف الکل با غلظت صعودی)، شفاف سازی (با استفاده از ۲ ظرف گزیلول (زایلین)[3]) و آغشتگی به پارافین انجام گرفت و سپس با استفاده از میکروتوم دوار، برش‌های بافتی به ضخامت ۵-۷ میکرومتر جهت مطالعه تغییرات ساختار بافتی، و ضخامت ۳ میکرومتر جهت مطالعه ایمونوهیستوشیمی، تهیه شد. به منظور مطالعه تغییرات ساختار بافتی، برش‌های مورد نظر با استفاده از رنگ هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری سه چشمی اولمپیوس متصل به دوربین دیجیتال، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند (۱۹).

تشخیص ایمونوهیستوشیمیایی سلول های آپوپتوز شده: جهت تشخیص سلول های آپوپتوز شده، هسته این سلول ها با استفاده از روش غیر رادیواکتیو نشان دار کردن انتهایی در جای خود[4]، رنگ شده و شناسایی گردید. در این روش، پس از تثبیت و طی مراحل معمول و استاندارد تهیه مقاطع بافتی، برش هایی به ضخامت ۳ میکرومتر تهیه گردید. سپس مقاطع با استفاده از دو ظرف گزیلول پارافین زدایی شده و با غلظت های نزولی الکل، آب دهی شدند و در نهایت، سه مرتبه با محلول بافر فسفات

1. Formalin
2. Histokit
3. Xylenol
4. In Situ end labeling

www.SID.ir

Archive of SID

عـاری از نوکلئـاز، شستشـو داده شـدند. جهـت از بیـن بردن پراکسـیداز هـای درون زا، مقاطـع بـا پراکسـید هیـدروژن ۰/۳ درصـد در متانـول بـه مـدت ۳۰ دقیقـه، در دمـای ۱۵ تـا ۲۵ درجه سـانتی گراد، انکوبه شـدند. سـپس مقاطع بعد از شستشـو با بافـر فسـفات عـاری از نوکلئاز با کمـک پروتئیناز **K**، تیمـار گردیدند (۱۹). کیـت آزمایشـگاهی مـورد اسـتفاده در ایـن تحقیـق، کیـت تشـخیص مـرگ سـلولی **POD** سـاخت شـرکت روژ آلمـان (کیـت شـماره ۱۱ ۶۶۸۴ ۸۱۷ ۹۱۰) بـود کـه تمامی مراحـل آن، مطابـق بـا دسـتورالعمل همـراه کیـت انجـام پذیرفـت. بـرای تعییـن شـاخص آپوپتـوزی در هـر مقطـع، ۱۰ میـدان دیـد میکروسـکوپی بـا بـزرگ نمایی بـالا به طور تصادفـی در هـر ناحیـه انتخـاب شـده و هسـته هـای تانـل مثبـت (هسـته هایـی بـه رنـگ قهـوه ای تیـره و یکنواخت) و تانـل منفـی، مـورد شـمارش قرار گرفتند. سـپس شـاخص آپوپتـوزی (**LI**)[1] از فرمـول زیـر محاسـبه گردیـد:

$$LI = a/(a+b)\times 100$$

کـه "**a**" تعـداد هسـته هـای تانـل مثبـت، و "**b**" تعـداد هسـته هـای تانـل منفـی، در هـر ناحیـه مـی باشـد (۱۹).

تجزیـه و تحلیـل آمـاری: جهـت تجزیـه و تحلیـل آمـاری از آزمـون کولموگـروف ـ اسـمیرنوف، آزمـون تحلیل واریانـس یـک طرفـه، و آزمـون تعقیبـی **LSD** اسـتفاده شـد. تمامـی محاسـبات بـا اسـتفاده از نرم‌افـزار **SPSS** نسـخه ۲۱ و در سـطح خطـای $\alpha \leq ۰/۰۵$ انجـام گرفـت.

یافته‌ها

شـکل ۱ میانگیـن شـاخص آپوپتـوزی کبـد نـوزادان را بـه صـورت درصـد نشـان می‌دهـد. شـاخص آپوپتـوزی کبـد در گروه‌هـای کادمیـوم ـ تمریـن، کادمیـوم ـ سـیلیمارین و کادمیـوم ـ تمریـن ـ سـیلیمارین در مقایسـه بـا گـروه کنتـرل، بـه ترتیـب بـه میـزان ۷۳/۵۷ درصـد (**p**<۰/۰۰۱) ۶۲/۶۲ درصـد (**p**<۰/۰۰۱) و ۴۷/۵۶ درصـد (**p**<۰/۰۰۱) بـا افزایـش معنـی دار همـراه بـود. همچنیـن، شـاخص آپوپتـوزی کبـد در گروه‌هـای کادمیـوم ـ سـیلیمارین (**p**<۰/۰۰۱)و کادمیـوم ـ تمریـن ـ سـیلیمارین (**p**<۰/۰۰۱) در مقایسـه بـا گـروه کادمیـوم، بـه طـور معنـی‌داری کاهـش یافـت. بـا ایـن حـال، همـان طـور کـه در شـکل ۱ مشـخص اسـت، شـاخص آپوپتـوزی کبـد تحـت تاثیـر تمریـن اسـتقامتی شـنا قـرار نگرفـت (**p**=۰/۸۳). شـکل ۲ نیـز تغییـرات ریخت‌شناسـی بافـت کبـد را در گروه‌هـای مختلـف بـه تصویـر کشـیده اسـت. سـلول‌های آپوپتـوزی در تصویـر بـا رنـگ قهـوه‌ای کامـلا مشـخص می‌باشـند.

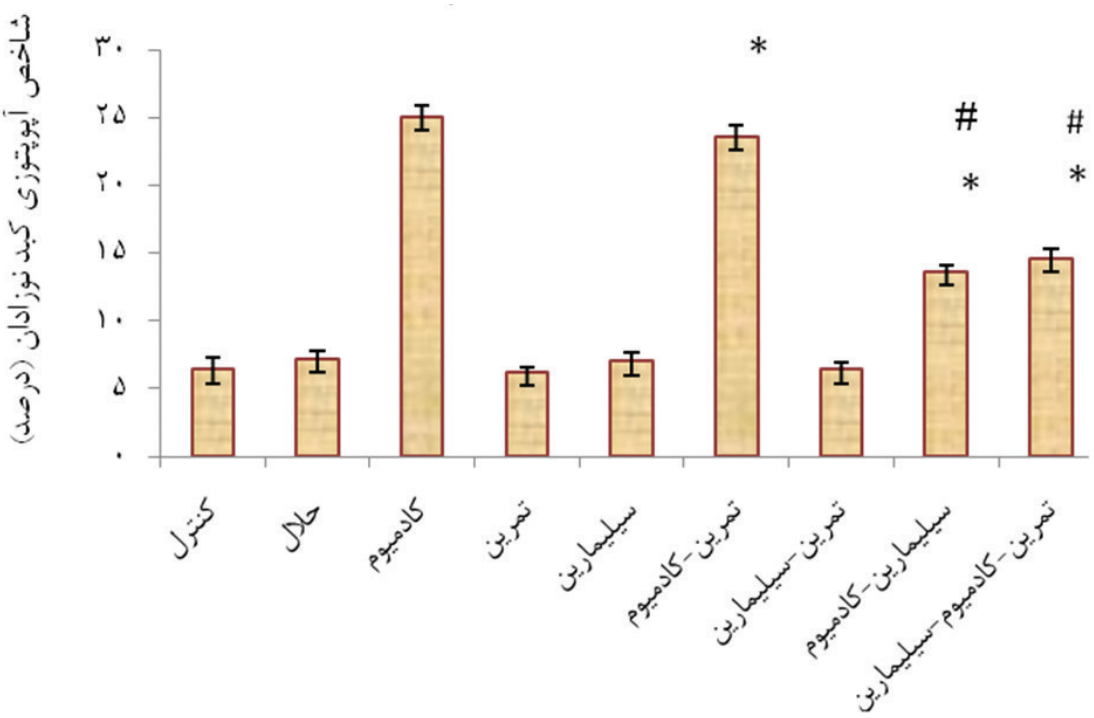
جدول ۱. شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان موش‌های مادر در گروه‌های مختلف در اثر تمرین شنا و مصرف کادمیوم .
نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد شده از میانگین (SEM) ارائه شده است.

گروه	میانگین (درصد)	خطای استاندارد میانگین	مقدار p
کنترل	۶/۴۰ ± ۱/۹۴	۰/۸۷	-
تمرین	۶/۲۰ ± ۰/۸۳	۰/۳۷	۰/۸۳
کادمیوم	۲۵/۰۰ ± ۱/۸۷	۰/۸۳	۰/۰۰۱
تمرین ـ کادمیوم	۲۳/۶۰ ± ۱/۸۱	۰/۸۱	۰/۰۰۱

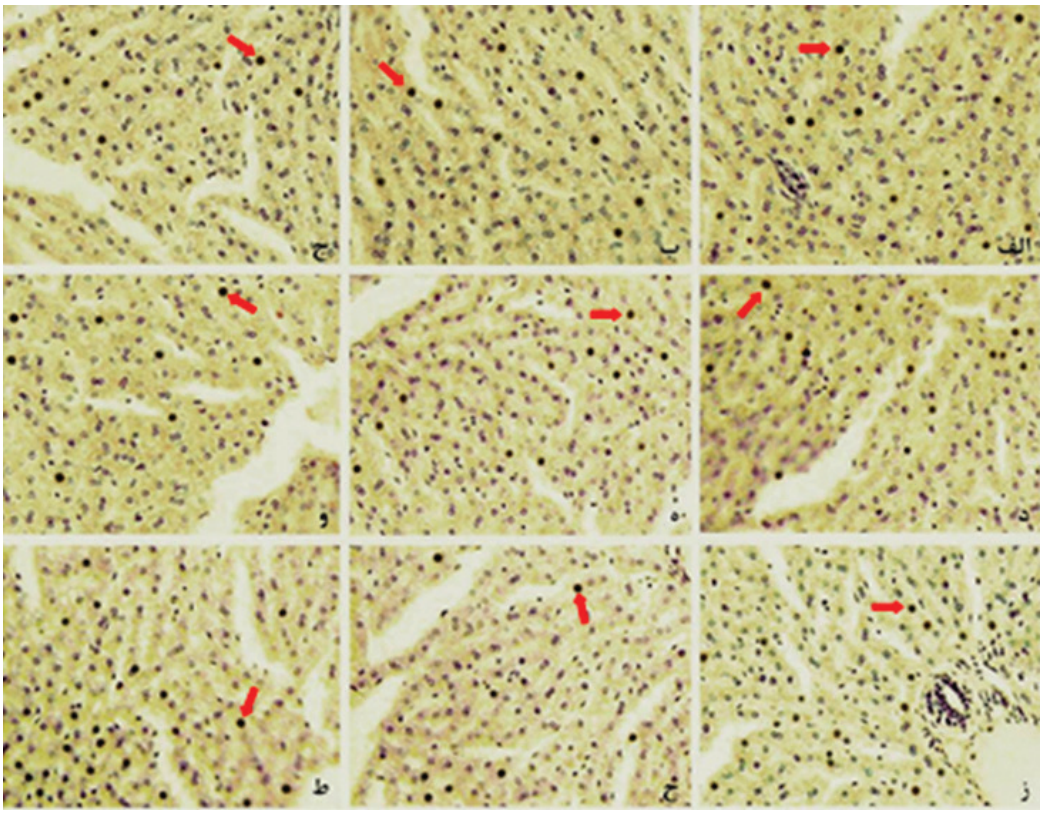
1. Labeling index

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان گروه‌های مختلف پژوهش. * نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($p \leq ۰/۰۰۱$)، # نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کادمیوم ($p \leq ۰/۰۰۱$).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپیک کبد نوزادان در گروه های مختلف (TUNEL, X۴۰). هسته های تیره (فلش) تانل مثبت بوده که بیانگر میزان القای آپوپتوزیس در سول های کبدی در گروه های تمرین (الف)، تمرین ـ سیلیمارین (ب)، حلال (ج)، کنترل (د)، سیلیمارین ـ کادمیوم (ه)، تمرین ـ کادمیوم (و)، سیلیمارین ـ کادمیوم ـ تمرین (ز)، سیلیمارین (ح)، و کادمیوم (ط) می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

یافته اصلی پژوهش حاکی از کاهش معنی‌دار شاخص آپوپتوزی کبد در گروه‌های سیلیمارین ـ کادمیوم و سیلیمارین ـ تمرین ـ کادمیوم در مقایسه با گروه کادمیوم می‌باشد. علاوه بر این، نتایج پژوهش حاضر نشان داد یک دوره برنامه تمرین شنای استقامتی موش‌های باردار، تغییر معنی‌داری در شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان موش های صحرایی ایجاد نمی کند. این یافته با نتایج هافمن[1] و همکاران (۲۰۰۹) همخوانی ندارد (۱۰). این ناهمخوانی احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع پروتکل به کار رفته در دو پژوهش می‌باشد. در پژوهش هافمن و همکاران، شاخص آپوپتوزی پس از یک جلسه فعالیت حاد بر روی نوار گردان و در پی ۱۶ هفته تمرین استقامتی اندازه‌گیری شده است؛ در حالی که پروتکل پژوهش حاضر سه هفته تمرین شنای استقامتی بود. اما نتایج با یافته های پژوهش کیم[2] و همکاران (۲۰۰۲) (۱۲) همسو می‌باشد. کادمیوم به طور موثر موجب عدم تعادل وضعیت اکسایشی ـ ضد اکسایشی بدن از طریق تولید **ROS**، می شود (۵). این عنصر در کبد به سرعت موجب تغییر عملکرد و آسیب سلولی شده و ترشح آنزیم‌های عملکردی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۸). نشان داده شده است که کادمیوم در اندام‌های مختلف موش صحرایی در درون بدن موجود زنده[3] و در سیستم‌های سلولی پستانداران در محیط آزمایشگاه[4]، آپوپتوزیس را القا می‌کند (۳۴)؛ و در غلظت‌های بسیار کم، احتمالاً از طریق هدف‌گیری میتوکندری بروز آپوپتوزیس را به همراه دارد. مسیر اصلی آپوپتوزیس وابسته به میتوکندری، مبتنی بر فعالیت کاسپاس ها[5] است که توسط آزادسازی مداوم سیتوکروم **C** میتوکندریایی، فعالیت کم کاسپاس ـ۹ آغازگر و کاسپاس ـ۳ مجری و گسستگی نهایی سوبستراهای خاص، میانجی‌گری می‌شود (۱۷). بقا و یا آپوپتوزیس سلول، به وسیله تعامل بین مولکول‌های آغازگر آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی تعیین می‌شود (۲۹). انواع مولکول‌های ضد آپوپتوزی مستقیم و غیرمستقیم توسط نیتریک اکساید[6] (**NO**) تحت تنظیم افزایشی قرار می‌گیرند. سو و همکاران (۲۰۱۰) پیشنهاد می‌کنند که در هنگام تمرینات ورزشی استقامتی با شدت متوسط به مدت ۸ هفته، **NO** در غلظت‌های فیزیولوژیکی به صورت معکوس سیتوکروم اکسیداز (کمپلکس **IV** از زنجیره انتقال الکترونی) را مهار می‌کند که منجر به هایپرپولاریزاسیون غشای میتوکندری می‌شود؛ از این رو، از آپوپتوزیس جلوگیری می‌کند (۲۹). پروتئین‌های مختلف ضد آپوپتوزی درون‌سلولی مانند نیتریک اکساید سنتاز القایی[7] (**iNOS**)، لوسمی سلول میلوئیدی یا مغز استخوانی[8] (**Mcl-۱**)، پروتئین تنظیم شده به وسیله گلوکز ۷۸[9] (**Grp۷۸**) و اینترلوکین ـ ۸ ؛ طی تمرین با شدت متوسط تحت تنظیم افزایشی قرار می‌گیرند و پس از بی‌تمرینی نیز در مقادیر بالا باقی می‌مانند.

سطوح **Mcl-۱** به عنوان میانجی ضد آپوپتوزی سیگنال **NO**، به دلیل تخلیه مولکول اصلی پایین دست سیگنال **NO**، یعنی گوانوزین مونوفسفات حلقوی[10] (**cGMP**)، افت می‌کند. به محض فعال‌سازی سیگنال **NO-cGMP**، نوتروفیل‌ها افزایش بیان **Mcl-۱** را حفظ کرده و روند آپوپتوزیس را کند می‌سازند. بنابراین، تصور می‌شود فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط، از طریق تنظیم افزایشی مسیر **Mcl-۱_cGMP_ iNOS_NO**، روند آپوپتوزیس را کند می‌سازد (۲۹). با توجه به این که در پژوهش حاضر تمرین تاثیری بر القا یا کاهش آپوپتوزیس نداشت، کاهش شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان موش های گروه تمرین ـ کادمیوم ـ سیلیمارین را می‌توان تنها به سیلیمارین نسبت داد. پیشنهاد شده است که سیلیمارین موجب تنظیم کاهشی بیان **mRNA** و پروتئین سیتوکروم **C** و **BAD**[11] می شود (۳۱). سیلیمارین عدم تعادل بین بقا و مرگ سلولی برنامه ریزی شده را به واسطه مداخله در بیان تنظیم‌کننده‌ها و پروتئین‌های چرخه سلولی درگیر در آپوپتوزیس، تعدیل می‌کند (۲۷) و با مکانیسم‌های متعدد از جمله: تحریک **DNA** پلی‌مراز، تثبیت غشای سلولی، مهار رادیکال‌های آزاد، و افزایش

1. Hoffman
2. Kim
3. In vivo
4. In vitro
5. Caspases
6. Nitric oxide
7. Inducible nitric oxide synthase
8. Myeloid cell leukemia-1
9. Glucose-regulated protein 78
10. c-Guanosine monophosphate
11. Bcl- 2- associated death promoter

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت **GSH** سلولی؛ اثر محافظت کبدی از خود نشان می‌دهد. تحریک **DNA** پلی‌مراز توسط سیلیمارین موجب افزایش **RNA** ریبوزومی و در نتیجه، بازسازی سلول‌های کبدی می‌شود (۶). ویژگی ضد اکسایشی و عملکردهای بازسازی سلولی به عنوان نتیجه افزایش سنتز پروتئین ها، مهمترین ویژگی سیلیمارین است. از آن‌جا که سیلیمارین در یک الگوی وابسته به دوز، اثرات ضد اکسایشی و ضد آپوپتوزی را اعمال می‌کند (۲۶)؛ احتمال می‌رود دوز به کار برده شده در پژوهش حاضر، برای کاهش میزان آپوپتوزیس ناشی از کادمیوم مناسب بوده و در ترکیب با تمرین شنا، برای درمان اثرات آپوپتوزی ناشی از کادمیوم، موجب کاهش ۴۱ درصدی شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان در پژوهش حاضر شده است. سیلیمارین از سد جفت عبور می‌کند و به میزان قابل توجهی در بافت‌هایی مانند کبد جنین، حضور می یابد و مقدار انتقال آن در سراسر جفت، با دوز داده شده به مادر رابطه دارد (۱۶). سیلیمارین با ورود به هسته و عمل بر آنزیم های **RNA** پلیمراز ۱ و رونویسی **rRNA**، به افزایش تشکیل ریبوزوم ها منجر می‌شود (۳۰). این عمل به نوبه خود سنتز پروتئین و **DNA** را تسریع می‌کند (۲۶)، روند ساخت و ساز در سیتوپلاسم را افزایش می‌دهد و به موجب آن، به افزایش میزان سنتز پروتئین‌های ساختاری و عملکردی منجر می‌شود. حداقل به لحاظ مفهومی، این تحریک ممکن است سلول را در مقابله با کاهش حامل‌ها و آنزیم‌هایی که تحت بسیاری از شرایط پاتولوژیک رخ می‌دهند، توانمند کند (۲۶). در همین راستا، آشتیانی و همکاران (۱۳۸۹) در پژوهشی گزارش کرده اند که تیمار سلول ها با سیلیمارین در مدت زمان مشخص، می‌تواند از طریق افزایش میزان بقای سلول‌های بنیادی و همچنین افزایش سرعت رشد، کارآیی این سلول‌ها در حیطه بالینی را افزایش دهد (۱). به منظور ایجاد توده مطلوب مرتبط با اندازه بدن، کبد مکانیسم های هیپرپلازی جبرانی را القا می‌کند و سیلیمارین چندین فاکتور رشدی را برای تنظیم چرخه سلولی و سنتز **DNA** در کبد تحریک می نماید (۳۱). سیلیمارین بر نفوذپذیری غشای میتوکندریایی و سلولی به همراه افزایش ثبات غشایی در برابر آسیب ژنوبیوتیک، عمل تنظیمی دارد (۲۲). سیلیمارین می‌تواند از جذب مواد سمی به هپاتوسیت‌ها، به وسیله اشغال مکان های اتصالی همانند ممانعت از بسیاری از پروتئین های انتقالی در غشا، پیشگیری کند (۷). در پژوهش‌های آزمایشگاهی، سیلیمارین مهار کننده قوی **cAMP**- فسفودی استراز است (۱۳)، بنابراین افزایش در سطوح **cAMP** کبدی ایجاد شده به وسیله سیلیمارین محتمل به نظر میرسد و ممکن است به عنوان یک پیک ثانویه برخی اثرات سودمند سیلیمارین (تثبیت غشاهای سلولی) عمل کند (۲۶).

نتیجه‌گیری: در مجموع، یافته‌های پژوهش حاضر دال بر آن است که تزریق سیلیمارین در دوران بارداری می‌تواند تا حدودی با آپوپتوزیس ناشی از مسمومیت با کادمیوم در کبد نوزادان موش های صحرایی مقابله کند و آن را کاهش دهد؛ اما تمرین شنای کوتاه مدت، تاثیری بر شاخص آپوپتوزی آن ها ندارد.

قدردانی و تشکر

نویسندگان از جناب آقای محمد علی‌نژاد و سرکار خانم مرضیه میردار جهت همکاری در اجرای این پژوهش قدردانی می‌نمایند. بخشی از منابع مالی این طرح توسط دانشگاه مازندران تامین گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Ashtiani, A., Alameh, H., Hamidipour, N., Rastegar, H., 2010. Increasing rate of human bone marrow mesenchymal stem cell proliferation in the presence of silymarin. *Journal of Medicinal Plants*, **vol. 9, no. 34, pp. 156-164. [persian]**

2. Boodaqi, H., Mahvi. A.H., Mohammadi, M.A., Dehqani, M.H., et al., 2009. Evaluation of amount of arsenic, cadmium and lead in soil and groundwater and its relationship with the fertilizers in Qaemshahr. *Journal of Mazandaran University Medical Science*, **vol. 21, no. 1, pp. 20-28. [persian]**

3. Bruscalupi, G., Massimi, M., Devirgiliis, L.C., Leoni, S., 2009. Multiple parameters are involved in the effects of cadmium on prenatal hepatocytes. Toxicology In Vitro, vol. 23, no. 7, pp. 1311-1318.

4. Douglas, M.T., Ying, L., 2010. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chemico-Biological Interactions*, **vol. 188, pp. 267-275.**

5. El, H.J., Sfar S., Hammouda, F., 2011. Interrelationships between cadmium, zinc and antioxidants in the liver of the rat exposed orally to relatively high doses of cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **vol. 74, pp. 2099-2104.**

6. Falah Hosseini, H., Hemmati, A., Alavian, S., 2004. A review of herbal medicine: Silybum marianum. *Journal of Medicinal Plant*s, **vol. 3, no. 11, pp. 14-24. [persian]**

7. Faulstich, H., Jahn, W., Wieland, T., 1980. Silybin inhibition of amatoxin uptake in Ne perfused rat liver. *Drug Research*, **vol. 30, no. 1, pp. 452-454.**

8. Fraschini, F., Demartini, G., Esposti, D., 2002. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation*, **vol. 22, no. 1, pp. 51-65.**

9. Hakkak-Dokht, E., Salami, F., Rajabi, H., Hedayati, M., 2011. Effect of aerobic training and vitamins E and C supplementation on GSH and antioxidative enzymes (GPX and SOD) in pregnant rats. *Journal of Olympic*, **vol. 3, no. 55, pp. 47-56. [persian]**

10. Hoffman-Goetz, L., Pervaiz, N., Guan, J., 2009. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF-alpha in intestinal lymphocytes. *Brain, Behavior, and Immunity*, **vol. 23, no. 4, pp. 498-506.**

11. Kantola, M., Purkunen, R., Kroger, P., Tooming, A., et al., 2000. Accumulation of cadmium, zinc, and copper in maternal blood and developmental placental tissue: differences between Finland, Estonia, and St. Petersburg. *Environmental Research Section*, **vol. 83, no. 1, pp.54-66.**

12. Kim, S.H., Kim, H.B., Jang, M.H., Lim, B.V., et al., 2002. Treadmill exercise increases cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. *Life Science*, **vol. 71, no. 11, pp.1331-1340.**

13. Koch, H.P., Loffler, E., 1985. Silymarin: Patent inhibitor of cyclic AMP phosphodiesterase. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **vol. 7, pp. 409-413.**

14. Koumentaki, A., Anthony, F., Poston, L., Wheeler, T., 2002. Low-protein diet impairs vascular relaxation in virgin and pregnant rats. *Clinical Science*, **vol. 102, no. 5, pp.553-560.**

15. Kuriwaki, J., Nishijo, M., Honda, R., Tawara, K., et al., 2005. Effects of cadmium exposure during pregnancy on trace elements in fetal rat liver and kidney. *Toxicology Letters*, **vol. 156, no. 3, pp. 369-376.**

16. La Grange, L., Wang, M., Watkins, R., Ortiz, D., et al., 1999. Protective effects of the flavonoid mixture, silymarin, on fetal rat brain and liver. *Journal of Ethnopharmacology*, **vol. 65, no. 1, pp. 53-61.**

17. Lemarie. A., Lagadic-Gossmann, D., Morzadec, C., Allain, N., et al., 2004. cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver hep3b cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease g and apoptosis-inducing factor. *Free Radical Biology and Medicine*, **vol. 36, pp. 1517-1531.**

18. Lupo, S., Hewitt, W.R., Rush, G.F., 1986. Cadmium toxicity in the isolated perfused rat liver. *Toxicology Letter*s. **vol. 34, no. 1, pp. 5-11.**

www.SID.ir

Archive of SID

19. Melen-Mucha, G., Balcerczak, E., Mucha, S., Panczyk, M., et al., 2004. Expression of p65 gene in experimental colon cancer under the influence of 5-fluorouracil given alone and in combination with hormonal modulation. *Neoplasma*, **vol. 51, no. 4, pp. 319-324.**

20. Milnerowicz, H., Nowak, P., Wielogorska, D., Wochynski, Z., et al., 2004. Effects of moderate physical exercise on blood and urine concentrations of cadium and metallothionein in runners. *Biology of Sport*, **vol. 21, no. 1, pp. 81-92.**

21. Mirdar S., Arab, A., Hedayati, M., Hajizadeh, A., 2013. Evaluation of the effect of a swimming training program on levels of lung hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in pups of mother rats exposed to cadmium. *Qom University Medical Science Journal*, **vol. 7, no. 3, pp. 11-20. [persian]**

22. Munter, K., Faulstich, H., 1986. Characterization of a transporting system in rat hepatocytes: studies with competitive and non-competitive inhibitors of phalloidin transport. *Biochimie Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes*, **vol. 860 no. 1, pp. 91-98.**

23. Patel, N., Joseph, C., Corcoran, G.B., Ray, S.D., 2010. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **vol. 245, no. 2, pp. 143-152.**

24. Prater, M.R., Laudermilch, C.L., Liang, C., Holladay, S.D., 2008. Placental oxidative stress alters expression of murine osteogenic genes and impairs fetal skeletal formation. *Placenta*, **vol. 29, pp.802–808.**

25. Queira J,. 2009. *Basic histology: text and atlas*. **Translated by: Montazeri, H. 12th ed. Tehran: Arjmand Pablication. pp. 366-378. [persian]**

26. Radko, L., Cybulski, W., 2007. Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical And Clinical Research*, **vol. 1, no. 1, pp. 22-26.**

27. Ramasamy, K., Agarwal, R., 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters*, **vol. 269, no. 2, pp.352-362.**

28. Scott, M., Arnold, R.L.Z., Tracey, V., Marc-Andre, R., 2006. Public health evaluation of cadmium concentrations in liver and kidney of moose (Alces alces) from four areas of Alask. *Science of the Total Environment*, **vol. 357 pp. 103– 111.**

29. Shu-Hui S., Chauying J.J., Hsiun-ing Ch., 2011. NO signaling in exercise training-induced anti-apoptotic effects in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **vol. 405, pp. 58–63.**

30. Sonnenbichler, J., Zetl, I., 1986. Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine, 1985*. **vol. 213, pp. 319-331.**

31. Tsai, C.C., Wu, J.P., Lin, Y.M., Yeh, Y.L., et al. 2013. The effect of Elephantopus scaber L. on liver regeneration after partial hepatectomy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **Vol. 2013, pp. 1-11.**

32. Van Pelt, L.F., 1977. Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *journal of the American Veterinary Medical Association*, **vol. 171, no. 9, p. 842.**

33. Waalkes, M.P., 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research*, **vol. 533, no. 1-2, pp.107-120.**

34. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, **vol. 192, no. 2-3, pp. 95-117.**

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract

The effect of swimming endurance training and silymarin supplementation during pregnancy on maternal cadmium exposure – induced apoptosis in hepatocytes of rat neonates

Shadmehr Mirdar Harijani[1], Hossein Aliasgharzade Oliaei[2], Gholamreza Hamidian[3], Narges Musavi[4]

Background and Aim: Both cell proliferation and apoptosis are required for proper development of the neonatal parenchyma of the liver. This study was conducted to evaluate the effects of swimming endurance training and silymarin supplementation during pregnancy on maternal cadmium – induced apoptosis in hepatocytes of neonates. **Materials and Methods:** 72 pregnant Wistar rats (200 ± 20 g) were divided into 9 groups. Cadmium chloride was given orally (400 mg/kg in drinking water) from the first day of pregnancy. Training protocol was included 60 minutes swimming for 5 days per week during pregnancy. Silymarin (100 mg/kg) was injected subcutaneously three times a week. Liver tissue was removed two days after born and apoptotic index also determined by nonradioactive in situ end labeling method using TUNEL immunocytochemical technique. The ANOVA and post hoc LSD tests were used to analyze the collected data at $p \leq 0.05$. **Results:** Apoptotic index of hepatocytes were decreased significantly in cadmium- silymarin and cadmium- silymarin-training groups ($p < 0.001$). Swimming training caused no significant changes in apoptotic index of hepatocytes ($p = 0.83$). **Conclusion:** Swimming endurance training during pregnancy probably have no effect on maternal cadmium – induced of apoptosis in hepatocytes of neonates, however, silymarin could reduce it.

Keywords: Cadmium, Swimming training, Silymarin, Apoptosis, Neonate liver.

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, vol. 2, no. 3, Spring & Summer, 2014
Received: Dec 29, 2013 *Accepted: Apr 23, 2014*

1. Corresponding Author, Associate Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran; Address: Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran,
Email: shadmehr.mirdar@gmail.com.
2. Master of Physical Education, Shahid Motahary High School, Education Department of Babol, Babol, Mazandaran, Iran.
3. Assistant Professor of Comparative Histology, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4. Master of Physical Education, University of Mazandaran, Iran.

www.SID.ir