

تاثیر تمرین استقامتی شنا و مکمل سیلیمارین در طی بارداری بر شاخص آپوتوزی سلول های کبد نوزادان موش های 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 آپوتوز 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 آپوتوزی سلول های کبد نوزادان موش های صحرایی در معرض مسمومیت با کادمیوم انجام گرفت. **روش تحقیق:** ۷۲ سر موش صحرایی باردار نژاد ویستار (وزن 20 ± 200 گرم) به ۹ گروه تقسیم شدند. کادمیوم کلراید به میزان ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت محلول در آب آشامیدنی به موش ها خوراندند. برنامه تمرینی در دوران بارداری ۶۰ دقیقه شنا در روز و به مدت ۵ روز در هفته بود. سیلیمارین (۱۰۰ میلی گرم 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 آپوتوزی کبد از تکنیک ایمونوهیستوشیمی تانل به روش غیر رادیواکتیو نشاندار کردن انتهایی در جای خود، استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل یافته ها از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی LSD در سطح خطای $0.05 \leq \alpha$ بهره برداری گردید. **یافته ها:** شاخص آپوتوزی کبد در گروه های کادمیوم - سیلیمارین و کادمیوم - تمرین - سیلیمارین در مقایسه با گروه کادمیوم، کاهش معنی داری ($p < 0.001$) نشان داد؛ اما تمرین شنا به تنهایی تاثیری بر شاخص آپوتوزی کبد نداشت ($p = 0.83$). نتیجه گیری: تمرین استقامتی شنا در طی بارداری تاثیری بر کاهش شاخص آپوتوزی سلول های کبد نوزادان ناشی از مسمومیت مادری با کادمیوم ندارد، اما تزریق سیلیمارین به طور احتمالی آن را کاهش می دهد.

واژه های کلیدی: کادمیوم، تمرین شنا، سیلیمارین، شاخص آپوتوزی، 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.

مقدمه

در مورد تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر آپوپتوزیس ناشی از کادمیوم، پژوهشی یافت نشده است؛ اما در پژوهشی مشابه، میلنروویچ^۴ 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^۵ 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 کرده‌اند که تیمار سلول‌ها با سیلیمارین در مدت زمان مشخص، می‌تواند با افزایش میزان بقای سلول‌های بنیادی و همچنین افزایش سرعت رشد، کارایی 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 تأثیر تمرین شنا یا مکمل سیلیمارین بر آپوپتوزیس ناشی از کادمیوم پرداخته باشد، تحقیق حاضر بر آن است تا تأثیر ترکیبی تمرین شنا 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 20 ± 200 گرم استفاده شد. موش‌ها به صورت گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد، و چرخه تاریکی - 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

کادمیوم^۱ 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 بافت‌ها می‌گردد (۳، ۴، ۳۳). قرارگرفتن در معرض کادمیوم در دوران بارداری از جذب و انتقال عناصر ضروری از جفت به جنین جلوگیری می‌کند و احتمالاً 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 0.34 میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (۲). قرارگیری دراز مدت در معرض کادمیوم منجر به دو شکل متفاوت مرگ سلولی، یعنی آپوپتوزی^۲ و نکروزی^۳ 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).

1. Cadmium
2. Apoptotic
3. Necrotic

4. Milnerowicz
5. Silymarin

در طول دوران بارداری به صورت زیرپوستی به آن‌ها 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 میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۳ میلی گرم 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^۱ 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^۲ 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 گزلیول (زایلین)^۳) و آغستگی 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 - آئوزین رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری سه چشمی اولمپیوس متصل به دوربین دیجیتال، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند (۱۹).

تشخیص ایمونوهیستوشیمیایی سلول‌های آپوپتوز شده: جهت تشخیص سلول‌های آپوپتوز شده، هسته این سلول‌ها با استفاده از روش غیر رادیواکتیو نشان دار کردن انتهایی در جای خود^۴، رنگ شده و شناسایی گردید. در این روش، پس از تثبیت و طی مراحل معمول و استاندارد تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۳ میکرومتر تهیه گردید. سپس مقاطع با استفاده از دو ظرف گزلیول پارافین زدایی شده و با غلظت‌های نزولی الکل، آب دهی شدند و در نهایت، سه مرتبه با محلول بافر فسفات

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 - تمرین، ۷. کادمیوم - سیلیمارین، ۸. سیلیمارین - تمرین، و ۹. کادمیوم - تمرین - 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 سانتیگراد)، 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 هفته‌های ۳ روز

واریانس یک طرفه، و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و در سطح خطای $\alpha \leq 0/05$ انجام گرفت.

یافته‌ها

شکل ۱ میانگین شاخص آپوتوزی کبد نوزادان را به صورت درصد نشان می‌دهد. شاخص آپوتوزی کبد در گروه‌های کادمیوم - تمرین، کادمیوم - سیلیمارین و کادمیوم - تمرین - سیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل، به ترتیب به میزان ۷۳/۵۷ درصد ($p < 0/001$)، ۶۲/۶۲ درصد ($p < 0/001$) و ۴۷/۵۶ درصد ($p < 0/001$) با افزایش معنی دار همراه بود. همچنین، شاخص آپوتوزی کبد در گروه‌های کادمیوم - سیلیمارین ($p < 0/001$) و کادمیوم - تمرین - سیلیمارین ($p < 0/001$) در مقایسه با گروه کادمیوم، به طور معنی‌داری کاهش یافت. با این حال، همان طور که در شکل ۱ مشخص است، شاخص آپوتوزی کبد تحت تأثیر تمرین استقامتی شنا قرار نگرفت ($p = 0/83$). شکل ۲ نیز تغییرات ریخت‌شناسی بافت کبد را در گروه‌های مختلف به تصویر کشیده است. سلول‌های آپوتوزی در تصویر با رنگ قهوه‌ای کاملاً مشخص می‌باشند.

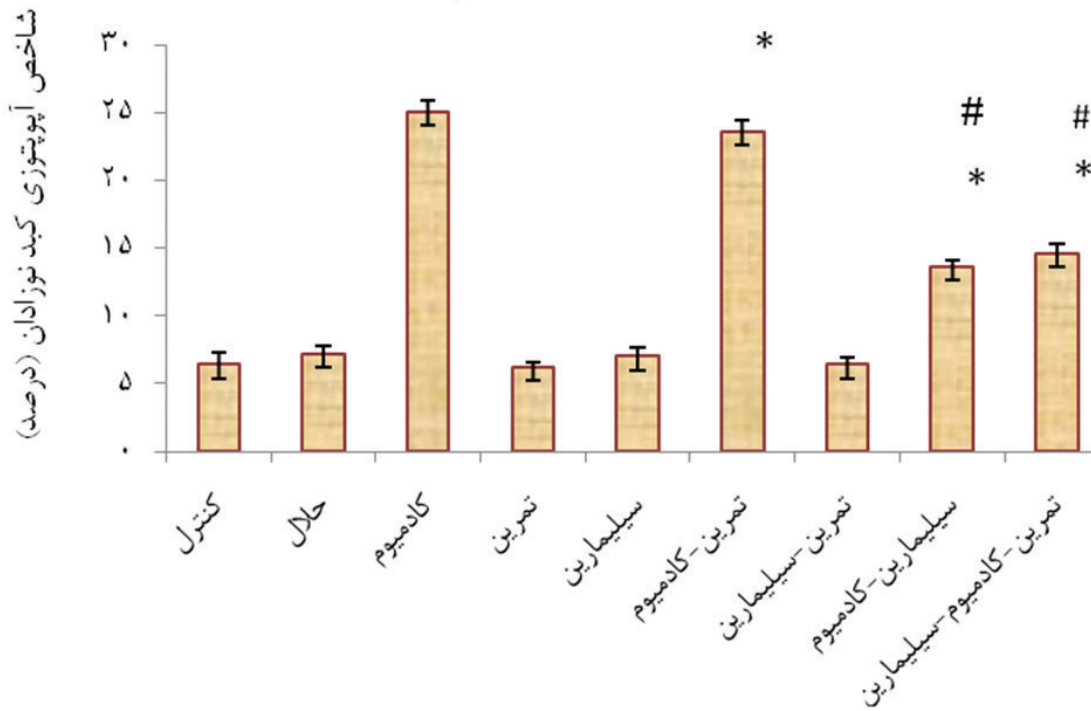
عاری از نوکلئاز، شستشو داده شدند. جهت از بین بردن پراکسیدازهای درون زه، مقاطع با پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد در متانول به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. سپس مقاطع بعد از شستشو با بفر فسفات‌عاری از نوکلئاز با کمک پروتئیناز K، تیمار گردیدند (۱۹). کیت آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق، کیت تشخیص مرگ سلولی POD ساخت شرکت روز آلمان (کیت شماره ۸۱۷۹۱۰ ۶۶۸۴ ۱۱) بود که تمامی مراحل آن، مطابق با دستورالعمل همراه کیت انجام پذیرفت. برای تعیین شاخص آپوتوزی در هر مقطع، ۱۰ میدان دید میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی بالا به طور تصادفی در هر ناحیه انتخاب شده و هسته‌های تانل مثبت (هسته‌هایی به رنگ قهوه‌ای تیره و یکنواخت) و تانل منفی، مورد شمارش قرار گرفتند. سپس شاخص آپوتوزی (LI)^۱ از فرمول زیر محاسبه گردید:

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

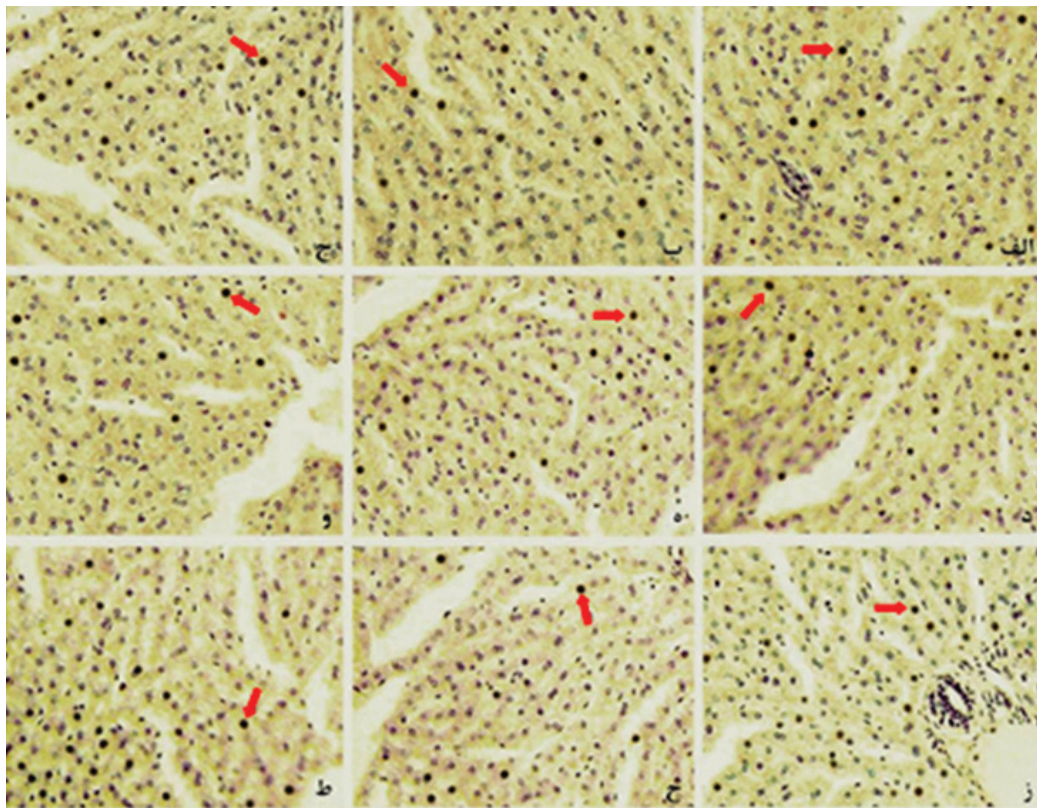
که "a" تعداد هسته‌های تانل مثبت، و "b" تعداد هسته‌های تانل منفی، در هر ناحیه می‌باشد (۱۹).
تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل آماری از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف، آزمون تحلیل

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

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



شکل ۱. شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان گروه‌های مختلف پژوهش. * نشانه معنی داری نسبت به گروه کنترل ($p \leq 0/001$)، # نشانه معنی داری نسبت به گروه کادمیوم ($p \leq 0/001$).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپی کبد نوزادان در گروه‌های مختلف (TUNEL, X40). هسته‌های تیره (فلش) تانل مثبت بوده که بیانگر میزان القای آپوپتوزیس در سول‌های کبدی در گروه‌های تمرین (الف)، تمرین-سیلیمارین (ب)، حلال (ج)، کنترل (د)، سیلیمارین-کادمیوم (ه)، تمرین-کادمیوم (و)، سیلیمارین-کادمیوم-تمرین (ز)، سیلیمارین (ح)، و کادمیوم (ط) می‌باشد.

بحث

اکساید^۶ (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 درون سلولی مانند نیتریک اکساید سنتاز القایی^۷ (iNOS)، لوسمی سلول میلوئیدی یا مغز استخوانی^۸ (Mcl-1)، پروتئین تنظیم شده به وسیله گلوکز^۹ (Grp78) و اینترلوکین - ۸؛ طی تمرین با شدت متوسط تحت تنظیم افزایشی قرار می‌گیرند و پس از بی‌تمرینی نیز در مقادیر بالا باقی می‌مانند.

سطوح Mcl-1 به عنوان میانجی ضد آپوپتوزی سیگنال NO، به دلیل تخلیه مولکول اصلی پایین دست سیگنال NO، یعنی گوانوزین مونوفسفات حلقوی^{۱۰} (cGMP)، افت می‌کند. به محض فعال‌سازی سیگنال NO-cGMP، نوتروفیل‌ها افزایش بیان Mcl-1 را حفظ کرده و روند آپوپتوزیس را کند می‌سازند. بنابراین، تصور می‌شود فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط، از طریق تنظیم افزایشی مسیر Mcl-1-cGMP-NO، روند آپوپتوزیس را کند می‌سازد (۲۹). با توجه به این که در پژوهش حاضر تمرین تأثیری بر القا یا کاهش آپوپتوزیس نداشت، کاهش شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان موش‌های گروه تمرین - کادمیوم - سیلیمارین را می‌توان تنها به سیلیمارین نسبت داد. پیشنهاد شده است که سیلیمارین موجب تنظیم کاهش بی‌ان mRNA و پروتئین سیتوکروم C و BAD^{۱۱} می‌شود (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

یافته اصلی پژوهش حاکی از کاهش معنی‌دار شاخص آپوپتوزی کبد در گروه‌های سیلیمارین - کادمیوم و سیلیمارین - تمرین - 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 موش‌های صحرایی ایجاد نمی‌کند. این یافته با نتایج هافمن^۱ 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 یافته‌های پژوهش کیم^۲ و همکاران (۲۰۰۲) (۱۲) همسو می‌باشد. کادمیوم به طور موثر موجب عدم تعادل وضعیت اکسایشی - ضد اکسایشی بدن از طریق تولید ROS، می‌شود (۵). این عنصر در کبد به سرعت موجب تغییر عملکرد و آسیب سلولی شده و تشریح آزمون‌های عملکردی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). نشان داده شده است که کادمیوم در اندام‌های مختلف موش صحرایی در درون بدن موجود زنده^۳ و در سیستم‌های سلولی پستانداران در محیط آزمایشگاه^۴، 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 کاسپاس‌ها^۵ است که توسط آزادسازی مداوم سیتوکروم C میتوکندریایی، فعالیت کم کاسپاس - ۹ آغازگر و کاسپاس - ۳ 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

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

تحریک می نماید (۳۱). سیلیمارین بر نفوذپذیری غشای میتوکندریایی و سلولی به همراه افزایش ثبات غشایی در برابر آسیب ژنوتوتیک، عمل تنظیمی دارد (۲۲). سیلیمارین می تواند از جذب مواد سمی به هیپاتوسیت ها، به وسیله اشغال مکان های اتصالی همانند ممانعت از بسیاری از پروتئین های انتقالی در غشا، پیشگیری کند (۷). در پژوهش های آزمایشگاهی، سیلیمارین مهار کننده قوی cAMP- فسفودی استراز است (۱۳)، بنابراین افزایش در سطوح cAMP کبدی ایجاد شده به وسیله سیلیمارین محتمل به نظر می رسد و ممکن است به عنوان یک پیک ثانویه برخی اثرات سودمند سیلیمارین (تثبیت غشاهای سلولی) عمل کند (۲۶).

نتیجه گیری: در مجموع، یافته های پژوهش حاضر دال بر آن است که تزریق سیلیمارین در دوران بارداری می تواند 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 علی نژاد و سرکار خانم مرضیه میردار جهت همکاری در اجرای این پژوهش قدردانی می نمایند. بخشی از منابع مالی این طرح توسط دانشگاه مازندران تامین گردیده است.

غلظت GSH سلولی؛ اثر محافظت کبدی از خود نشان می دهد. تحریک DNA پلی مرز توسط سیلیمارین موجب افزایش RNA ریبوزومی و در نتیجه، بازسازی سلول های کبدی می شود (۶). ویژگی ضد اکسایشی و عملکردهای بازسازی سلولی به عنوان نتیجه افزایش سنتز پروتئین ها، مهمترین ویژگی سیلیمارین است. از آن جا که سیلیمارین در یک الگوی وابسته به دوز، اثرات ضد اکسایشی و ضد آپوپتوزی را اعمال می کند (۲۶)؛ احتمال می رود 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 می کند و به میزان قابل توجهی در بافت هایی 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 پلیمرز ۱ و رونویسی rRNA، به افزایش تشکیل ریبوزوم ها منجر می شود (۳۰). این عمل به نوبه خود سنتز پروتئین و DNA را تسریع می کند (۲۶)، روند ساخت و ساز در سیتوپلاسم را افزایش می دهد و به موجب آن، به افزایش میزان سنتز پروتئین های ساختاری و عملکردی منجر می شود. حداقل به لحاظ مفهومی، این تحریک ممکن است سلول را در مقابله با کاهش حامل ها و آنزیم هایی که تحت بسیاری از شرایط پاتولوژیک رخ می دهند، 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، می تواند از طریق افزایش میزان بقای سلول های بنیادی و همچنین افزایش سرعت رشد، کارایی این سلول ها در حیطه بالینی را افزایش دهد (۱). به منظور ایجاد توده مطلوب مرتبط با اندازه بدن، کبد مکانیسم های هیپرپلازی جبرانی را القا می کند و سیلیمارین چندین فاکتور رشدی را برای تنظیم چرخه سلولی و سنتز DNA در کبد

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. Boodaqui, 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 Plants*, 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. Frascini, 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 Letters*. vol. 34, no. 1, pp. 5-11.

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 cadmium 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 Publication. 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 Alaska. *Science of the Total Environment*, vol. 357 pp. 103- 111.
29. Shu-Hui S., Chausing 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.

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 Harijani¹, Hossein Aliasgharzade Oliaei²,
Gholamreza Hamidian³, Narges Musavi⁴

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.