

## تأثیر تمرین استقامتی شنا و مکمل سیلیمارین بر تغییرات شاخص آپوتوزی کبد موش‌های صحرایی باردار در معرض مسمومیت کادمیوم

شادمهر میردار هریجانی<sup>۱</sup>، نرگس موسوی<sup>۲</sup>، غلامرضا حمیدیان<sup>۳</sup>، حسین علی اصغرزاده اولیایی<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۹۲/۹/۲۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۲/۱۱/۱۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۶/۱۲ پذیرش مقاله: ۹۳/۶/۱۹

### چکیده

**زمینه و هدف:** تنظیم نا بهنجار مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوتوز)، باعث پیشروی فرایندهای آسیب‌شناختی در جفت زنان باردار شده و بر فرایند رشد جنین تأثیر می‌گذارد. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین شنای استقامتی و مصرف سیلیمارین بر تغییرات شاخص آپوتوزی کبد ناشی از مسمومیت با کادمیوم در موش‌های صحرایی باردار بود.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی روی ۷۲ سر موش صحرایی ماده در ۹ گروه قرار انجام شد. برنامه تمرین شامل شنای استقامتی از روز اول بارداری تا روز زایمان بود. کادمیوم کلراید به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در لیتر به صورت محلول در آب خوراکی داده شد و سیلیمارین نیز به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیرپوستی ۳ بار در هفته تزریق شد. برای تعیین شاخص آپوتوزی کبد از روش ایمونوهیستوشیمی TUNEL به روش غیر رادیواکتیو نشاندار کردن انتهایی در جای خود استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی (LSD) گردید.

**یافته‌ها:** کادمیوم به طور معنی‌داری شاخص آپوتوزی کبد موش‌های مادر را افزایش داد ( $p=0/001$ )، اما تمرین شنا تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد ( $p=0/424$ ). تمرین شنا و تزریق سیلیمارین شاخص آپوتوزی کبد را نسبت به گروه کادمیوم به طور معنی‌داری کاهش دادند ( $p=0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** تمرین شنا و مکمل سیلیمارین در ترکیب باهم می‌تواند به میزان قابل توجهی با آپوتوز القا شده توسط کادمیوم در بافت کبد موش‌های باردار مقابله کنند.

**واژه‌های کلیدی:** شاخص آپوتوزی، موش صحرایی باردار، سیلیمارین، کادمیوم، تمرین شنا

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تلفن: ۰۱۱۲-۵۲۴۴۷۰۵، دورنگار: ۰۱۱۲-۵۲۴۴۷۰۵، پست الکترونیکی: shadmehr.mirdar@gmail.com

۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳- استادیار بافت شناسی گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴- کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، واحد تربیت بدنی، اداره آموزش و پرورش شهرستان بابل، مازندران، ایران

## مقدمه

در طی تغییرات متابولیسمی در دوران بارداری، تماس مادر با فلزات سنگین برای عملکرد جفت و سلامت جنین بسیار مهم تلقی شده و گفته شده است که کادمیوم (Cadmium) اثرات سمی بر رویان و جنین دارد [۱]. کادمیوم یک فلز سمی سنگین با عملکردهای زیستی ویژه است که در انسان و حیوان از طریق آب و غذا وارد بدن شده و ابتدا در کبد و کلیه انباشته می‌شود و موجب اثرات زیان بار بر این دو اندام و سایر اندام‌های بدن می‌گردد. این ماده سمی به طور موثر موجب عدم تعادل وضعیت اکسیدان-آنتی‌اکسیدان بدن می‌گردد [۲]. همچنین، پژوهش‌ها نشان داده‌اند تجمع کادمیوم در جفت مادران سیگاری در طی سه ماهه اول دوره بارداری شروع شده [۱] و می‌تواند باعث القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) در اندام‌های مختلف موش صحرایی شود [۳].

مرگ سلولی آپوپتوزی (Apoptotic cell death) یک فرایند طبیعی در کنترل جمعیت سلول‌ها و حذف سلول‌های آسیب دیده است [۴]. از سوی دیگر، اثرات مفید تمرین استقامتی شنا و عدم نیاز به تحمل وزن بر سازوکارهای دفاع آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف بررسی شده و این اثرات در موش‌های شناگر، موش‌های سالم دوندۀ روی نوارگردان و موش‌های دیابتی تمرین کرده مشاهده شده است [۵]. اما اکنون سؤال این است که آیا تمرین شنا می‌تواند القای آپوپتوز ناشی از مسمومیت با کادمیوم را کاهش دهد؟ در همین راستا، تنها یک پژوهش یافته شده است که گزارش کرده است غلظت بالاتر

کادمیوم در خون و ادرار پس از فعالیت ورزشی در دوندگان مرد سیگاری نشان دهنده تأثیر مثبت فعالیت ورزشی بر دفع کادمیوم می‌باشد [۶]. به نظر می‌رسد در این زمینه پژوهش‌های اندکی وجود دارد علاوه بر این که هیچ پژوهشی بر روی موش‌های باردار در معرض مسمومیت کادمیوم نیز مشاهده نشده است. از سوی دیگر، پژوهش‌های بالینی بر روی مواد مسموم‌کننده سلول‌های کبدی نشان داده است که سیلیمارین (Silymarin)، یکی از ترکیبات مشتق از گیاه خارمریم (Milk testile)، به عنوان عامل محافظت از سلول‌های کبدی اعمال چندگانه‌ای دارد [۷-۸].

ویژگی‌های محافظت‌کنندگی کبد سیلیمارین شامل جلوگیری از تخلیه گلووتاتیون (Glutathione- GSH)، تخریب و انهدام رادیکال‌های آزاد، حفظ سنتز پروتئین کبدی از طریق فعال‌سازی RNA و محافظت از عملکرد انتقال میتوکندریایی است [۹]. با توجه به اثرات سمی کادمیوم و نظر به اثرات آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین، هدف پژوهش حاضر این است که نقش حفاظتی سیلیمارین و تمرین استقامتی شنا را بر مسمومیت ناشی از کادمیوم خوراکی و تأثیر آن بر القای آپوپتوز کبد در موش‌های صحرایی که در دوران بارداری در معرض مسمومیت با کادمیوم قرار گرفته‌اند بررسی نماید.

## روش انجام آزمایش

**آزمودنی‌ها:** این مطالعه تجربی روی ۷۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با میانگین وزنی  $20 \pm 200$  گرم، به منظور سازگاری با محیط و تمرین شنا به مدت یک هفته در مکانی ویژه با دمای کنترل شده  $23 \pm 2$  درجه

سانتی‌گراد، با شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، به همراه آب و غذای کافی قرار گرفتند. در طی این یک هفته موش‌های صحرایی تمرینات کوتاه مدت شنا را انجام دادند. سپس هر دو موش صحرایی ماده با یک موش صحرایی نر جهت جفت‌گیری در یک قفس قرار گرفته و پس از ۴۸ ساعت با بررسی توده واژینال، روز اول بارداری مشخص شد. سپس موش‌های صحرایی به ۹ گروه ۸ تایی: کنترل، حلال، کادمیوم، تمرین، سیلیمارین، سیلیمارین - تمرین، سیلیمارین - کادمیوم، کادمیوم - تمرین، کادمیوم - سیلیمارین - تمرین تقسیم شدند. موش‌های صحرایی باردار گروه تمرین، یک بار در روز و پنج روز در هفته در استخر ویژه‌ای به ابعاد  $50 \times 50 \times 100$  سانتی‌متر که توسط Mirdar و همکاران در دانشکده تربیت بدنی دانشگاه مازندران ساخته شده بود به شنا پرداختند. برنامه اصلی تمرین شنا در دوران بارداری با ۳۰ دقیقه آغاز شد که این مدت با افزایش پنج دقیقه روزانه به 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 انجام می‌شد که در هفته سازگاری با تمرین، ثابت بود. 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 می‌یافت [۱۰].

کادمیوم کلراید به صورت محلول به میزان ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در لیتر، از طریق آب آشامیدنی به موش‌های صحرایی داده شد [۱۱]. بر این اساس میزان ۲ گرم کادمیوم در ۵ لیتر آب کاملاً حل و در ظروف ویژه

آب ریخته شد و به صورت ۲۴ ساعته در اختیار شان قرار گرفت.

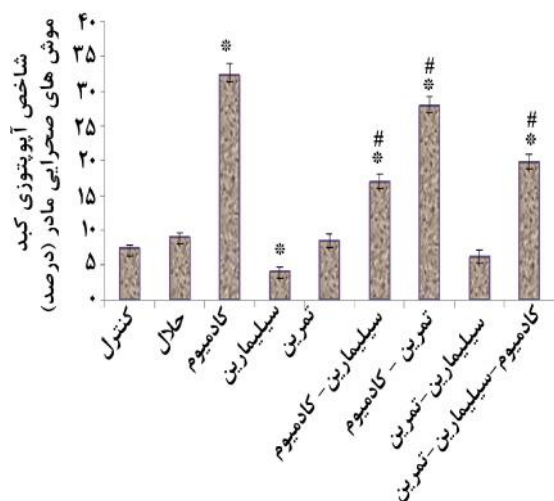
برای تهیه سیلیمارین ابتدا  $1/6$  گرم پودر سیلیمارین در ۴ میلی لیتر اتانول مطلق حل شده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۶ میلی لیتر رسانده شد. دوز سیلیمارین، ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن موش‌های صحرایی بود که هفته‌ای ۳ روز در طول دوران بارداری به صورت زیرپوستی تزریق می‌شد [۱۲]. حلال سیلیمارین هم به همان صورت تهیه (۴ میلی لیتر اتانول مطلق با ۱۲ میلی لیتر آب مقطر) و به آزمودنی‌های گروه حلال تزریق شد.

موش‌های صحرایی ماده دو روز پس از زایمان با زایلازین (Xylazine) (۱۳ میلی گرم بر کیلوگرم) و کتامین (Ketamine) (۸۷ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش و آسان کشی شده و سپس کبد آنها خارج شد [۱۳].

جهت تشخیص سلول‌های آپوپتوزی، هسته این سلول‌ها با استفاده از روش غیر رادیواکتیو نشان‌دار کردن انتهایی در جای خود (In situ end labeling) رنگ شده و شناسایی گردید.

در این روش، مقاطع تهیه شده به ضخامت ۳ میکرومتر ابتدا با استفاده از دو ظرف زایلول، پارافین زدایی شده و سپس با غلظت‌های نزولی الکل آب‌دهی و در نهایت سه مرتبه با محلول بافر فسفات عاری از نوکلئاز شستشو شدند. جهت از بین بردن پراکسیدازهای درون‌زاد، مقاطع با پراکسید هیدروژن  $3/0\%$  در متانول به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مقاطع، بعد از شستشو با بافر فسفات عاری از نوکلئاز با کمک پروتئین کیناز K تیمار شدند. کیت آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق کیت تشخیص مرگ سلولی

ناشی از مسمومیت با کادمیوم را به میزان قابل توجهی (۳۸٪) کاهش دادند. شکل ۱ و نمودار ۱ شاخص آپوپتوزی را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.



نمودار ۱- شاخص آپوپتوزی کبد موش‌های صحرایی مادر. علامت \* نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل ( $p = 0/001$ ) و علامت # نشانه معناداری نسبت به گروه کادمیوم ( $p = 0/001$ ) است.

POD (ساخت شرکت Roche آلمان) بود که تمامی مراحل آن مطابق با دستورالعمل همراه کیت انجام پذیرفت. برای تعیین شاخص آپوپتوزی در هر مقطع، ۱۰ میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی بالا (بزرگنمایی ۱۰۰) به طور تصادفی انتخاب شده و هسته‌های Terminal Deoxynucleotidyl Transferase mediated (Deoxyuridine Triphosphate Nick-End Labeling-TUNEL مثبت (هسته‌هایی به رنگ قهوه‌ای تیره و یکنواخت) و TUNEL منفی مورد شمارش قرار گرفت. سپس شاخص آپوپتوزی با استفاده از رابطه  $LI = a/(a+b) \times 100$  محاسبه گردید که در آن "a" تعداد هسته‌های TUNEL مثبت و "b" تعداد هسته‌های TUNEL منفی در هر میدان دید میکروسکوپی می‌باشد [۱۴].

کلیه مراحل تمرین و اجرای پژوهش مطابق با دستورالعمل موسسه سلامت و تغذیه در مورد مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و کمیته اخلاق دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه مازندران انجام شد. برای تجزیه و تحلیل یافته‌های این پژوهش از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی در سطح خطای  $\alpha \leq 0/05$  LSD استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت.

## نتایج

بیشترین افزایش شاخص آپوپتوزی در گروه کادمیوم (۴۳٪) در مقایسه با گروه کنترل رخ داده است (شکل ۱). همچنین، شاخص آپوپتوزی کبد موش‌های مادر گروه سیلیمارین کاهش معنی‌داری به میزان ۴۳/۲۴٪ را نسبت به گروه کنترل نشان داد. تمرین شنای استقامتی و سیلیمارین در ترکیب با یکدیگر شاخص آپوپتوزی کبد

شکل ۱- تصویر میکروسکوپی کبد در گروه‌های مختلف (TUNEL, X40)

هسته‌های قهوه‌ای تیره هسته‌های TUNEL مثبت بوده و بیانگر میزان القاء آپوپتوز در سلول‌های کبدی در گروه‌های تمرین (الف)، تمرین-سیلیمارین (ب)، حلال (ج)، کنترل (د)، سیلیمارین-کادمیوم (ه)، سیلیمارین (و)، تمرین کادمیوم (ز)، کادمیوم (ح) و سیلیمارین-کادمیوم-تمرین (ط) را نشان می‌دهد.

### بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد کادمیوم باعث القای معنی‌دار ۴ برابری آپوپتوز کبد موش‌های صحرایی باردار در مقایسه با گروه کنترل شد. این یافته با نتایج پژوهش Ye و همکاران و Pham و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد [۱۵-۱۶].

یافته مهم این پژوهش حاکی از این است که تمرین و سیلیمارین در ترکیب با یکدیگر شاخص آپوپتوز ناشی از مسمومیت با کادمیوم را به طور معنی‌داری کاهش دادند. القای آپوپتوز توسط کادمیوم احتمالاً از طریق هدف‌گیری میتوکندری صورت می‌گیرد و آپوپتوز وابسته به میتوکندری نیز حداقل از دو مسیر متفاوت میانجی‌گری می‌شود. مسیر اصلی مبتنی بر فعالیت کاسپازها (Caspases) است که توسط آزادسازی مداوم سیتوکروم C میتوکندریایی، فعالیت کاسپاز-۹ آغازگر و کاسپاز-۳ مجری و گسستگی نهایی سوبستراهای خاص میانجی‌گری می‌شود [۱۷].

به دنبال استرس‌های مختلفی که منجر به رها شدن یون کلسیم ( $Ca^{2+}$ ) از شبکه اندوپلاسمی می‌شوند، میتوکندری نقش مهمی در جمع‌آوری این کلسیم‌های

سیتوزولی ایفا می‌کند. در واقع آزادسازی سریع  $Ca^{2+}$  از لومن شبکه اندوپلاسمی باعث القای نفوذپذیری غشای میتوکندری و تحریک پاسخ‌های آپوپتوزی می‌شود [۱۷]. در سلول‌های سالم، میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی جایگاه‌های تماس زیادی دارند که انتقال  $Ca^{2+}$  را بین این دو اندامک تسهیل می‌کند. هرگونه تغییر در مورفولوژی شبکه اندوپلاسمی و یا قطعه قطعه شدن میتوکندری می‌تواند باعث زایل شدن نقاط تماس بین این دو اندامک و ممانعت از تعامل بین آنها گردد [۱۸].

از آنجایی که میتوکندری یک اندامک کلیدی در کنترل آپوپتوز است و دپلاریزاسیون غشای آن باعث رها شدن عوامل پروآپوپتوزی می‌شود، پژوهشگران در توجیه کاهش میزان آپوپتوز در اثر تمرین استقامتی با شدت متوسط پیشنهاد کردند نیتریک اکساید (Nitric Oxide- NO) در غلظت‌های فیزیولوژیکی به صورت معکوس سیتوکروم اکسیداز (کمپلکس IV از زنجیره انتقال الکترونی) را مهار می‌کند که منجر به هایپرپلاریزاسیون غشای میتوکندری می‌گردد و بنابراین از آپوپتوز جلوگیری می‌کند. همچنین، انواع مولکول‌های آنتی‌آپوپتوزی مستقیم و غیرمستقیم توسط NO تحت تنظیم افزایشی قرار می‌گیرند [۱۹]. پروتئین‌های مختلف آنتی‌آپوپتوزی درون سلولی مانند نیتریک اکساید سنتاز القایی (Inducible nitric oxide synthase- iNOS)، لوسمی سلول میلوئیدی یا مغز استخوانی (Myeloid cell leukemia-1- Mcl-1)، پروتئین تنظیم شده به وسیله گلوکز ۷۸ (Glucose-regulated protein 78- Grp78) و اینترلوکین-۸ در طی تمرین با شدت متوسط تحت تنظیم افزایشی قرار می‌گیرند و پس

از بی تمرینی نیز در مقادیر بالا باقی می ماند. سطوح Mcl-1 به عنوان میانجی آنتی آپوپتوزی سیگنال NO به دلیل تخلیه مولکول اصلی پایین دست سیگنال NO یعنی گوانوزین مونوفسفات حلقوی (Cyclic-Guanosine monophosphate- cGMP) سقوط می کند.

به محض فعال سازی سیگنال NO-cGMP، برخی بافت های بدن افزایش بیان Mcl-1 را حفظ کرده و روند آپوپتوز را کند می سازند. بنابراین پیشنهاد می شود فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط از طریق تنظیم افزایشی مسیر iNOS-NO-cGMP-Mcl-1 روند آپوپتوز را کند سازد [۱۹]. به خوبی نشان داده شده است تمرینات ورزشی منظم وضعیت آنتی اکسیدانی را در بسیاری از بافت ها از جمله کبد بهبود می بخشد [۲۰]. شکل ۱ مربوط به سلول های آپوپتوزی کبد موش های صحرایی گروه های تمرین - کادمیوم و تمرین - سیلیمارین - کادمیوم در پژوهش حاضر نیز نشان می دهد که تمرین شنای استقامتی توانسته است آپوپتوز ناشی از مسمومیت با کادمیوم را کاهش دهد. این یافته در راستای نتایج پژوهش Milnerowicz و همکاران می باشد که پیش از این تأثیر دویدن با شدت متوسط را بر دفع کادمیوم از طریق ادرار نشان داده بودند [۶].

علاوه بر تمرین شنا، سیلیمارین نیز با مکانیسم های متعدد از جمله تحریک DNA پلی مرز، تثبیت غشای سلولی، مهار رادیکال های آزاد و افزایش غلظت GSH گلو تاتیون احیا شده) سلولی اثر محافظت کبدی از خود نشان داده است [۲۱] که کاهش القای آپوپتوز ناشی از کادمیوم در گروه سیلیمارین- کادمیوم نیز گواه این ادعا

می باشد. تحریک DNA پلی مرز توسط سیلیمارین موجب افزایش RNA ریبوزومی و در نتیجه بازسازی سلول های کبدی می شود. افزایش غلظت GSH سلولی نیز موجب تثبیت سوپراکساید دیسموتاز و گلو تاتیون پراکسیداز سلولی می گردد که همگی از آنزیم های آنتی اکسیدانی مهم هستند [۲۱].

احتمالاً سیلیمارین عدم تعادل بین بقا و مرگ سلولی آپوپتوزی را به واسطه مداخله در بیان تنظیم کننده ها و پروتئین های چرخه سلولی درگیر در آپوپتوز تعدیل می کند [۲۲]. ویژگی آنتی اکسیدانی و عملکردهای بازسازی سلولی به عنوان نتیجه افزایش سنتز پروتئین ها مهمترین ویژگی سیلیمارین است. خاصیت تعدیل کنندگی دستگاه ایمنی، ضد التهابی، ضد تکثری و ضد ویروسی سیلیمارین ممکن است وابسته به دوز مصرفی و شکل مولکولی آن باشد [۷]. بنابراین سیلیمارین در یک الگوی وابسته به دوز، ممکن است در کاهش آبشاری التهاب مزمن در مدل های حیوانی مؤثر باشد [۲۳].

در پژوهش حاضر نیز در اثر تزریق سیلیمارین در سرتاسر دوران بارداری، شاخص آپوپتوزی کبد موش های صحرایی ماده به طور معنی داری کاهش یافت. کاهش شاخص آپوپتوزی کبد با اجرای تمرین شنای استقامتی به همراه مصرف سیلیمارین بسیار چشمگیرتر از تمرین به تنهایی یا مصرف سیلیمارین به تنهایی بوده است و این نشان دهنده تأثیر مثبت این دو فاکتور در ترکیب با یکدیگر جهت کنترل القای آپوپتوز ناشی از کادمیوم در بافت کبد می باشد.

## نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد محلول آشامیدنی کادمیوم در طی بارداری باعث افزایش معنی‌دار آپوپتوز کبدی موش‌های صحرایی مادر شد که می‌تواند برای آن و چه بسا برای جنین خطرناک باشد. اما تمرین شنای استقامتی به همراه مصرف سیلیمارین جهت کنترل شرایط زیان‌آور

کادمیوم در کبد موش‌های صحرایی مادر اثربخش بوده است. نتایج پژوهش حاضر مختص موش‌های صحرایی مادر می‌باشد و بنابراین محقق پژوهش‌های بیشتر را در رابطه با شاخص آپوپتوزی کبد نوزادان این مادران پیشنهاد می‌کند.

## References

- [1] Kantola M, Purkunen R, Kroger P, Tooming A, Juravskaja J, Pasanen M, et al. Accumulation of cadmium, zinc, and copper in maternal blood and developmental placental tissue: differences between Finland, Estonia, and St. Petersburg. *Environ Res Sect* 2000; 83(1): 54-66.
- [2] Jihen EH, Sfar S, Hammouda F. Interrelationships between cadmium, zinc and antioxidants in the liver of the rat exposed orally to relatively high doses of cadmium and zinc. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011; 74: 2099-104.
- [3] Waisberg M, Joseph P, Hale B and Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol* 2003; 192(2-3): 95-117.
- [4] Queira J. Basic histology: text and atlas. 12th ed 2010.
- [5] Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, et al. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol* 2004; 91(5-6): 622-7.
- [6] Milnerowicz H, Nowak P, Wielogorska D, Wochynski Z, Sobiech K. Effects of moderate physical exercise on blood and urine concentrations of cadmium and metallothionein in runners. *Biol Sport* 2004; 21(1): 81-92.
- [7] Hale Z, Toklu T, Ayliz V, Feriha E, Nursal G, Meral K, Goksel S. Silymarin, the Antioxidant Component of Silybum marianum, Prevents Sepsis-

- Induced Acute Lung and Brain Injury. *J Surg Res* 2008; 145: 214-22.
- [8] Lidia R and Cybulski W. Application of silymarin in human and animal medicine. *J Pre-Clin & Clin Res* 2007; 1(1): 22-6.
- [9] La Grange L, Wang M, Watkins R, Ortiz D, Sanchez M E, Konst J, et al. Protective effects of the flavonoid mixture, silymarin, on fetal rat brain and liver. *J Ethnopharmacol* 1999; 65(1): 53-61.
- [10] Mirdar S, Arab A, hedayati M and Hajizade A. The effect of pregnant rat swimming on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  levels of neonatal lung. *Tehran Univ Med J* 2012; 69: 754-60.
- [11] Barański B, Stetkiewicz I, Trzcinka-Ochocka M, Sitarek K and Szymczak W. Teratogenicity, fetal toxicity and tissue concentration of cadmium administered to female rats during organogenesis. *J Appl Toxicol* 1982; 2(5): 255-59.
- [12] Fraschini F, Demartini G and Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clin Drug Invest* 2002; 22(1): 51-65.
- [13] Van Pelt L. Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *J Am Vet Med Assoc* 1977; 171(9): 842.
- [14] Melen-Mucha G, Balcerczak E, Mucha S, Panczyk M, Lipa S, Mirowski M. Expression of p65 gene in experimental colon cancer under the influence of 5-fluorouracil given alone and in combination with hormonal modulation. *Neoplasma* 2004; 51(4): 319-24.
- [15] Ye J L, Mao W P, Wu A L, Zhang N N, Zhang C, Yu Y J, et al. Cadmium-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by acting on mitochondria and regulating Ca(2+) signals. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 24(1): 45-54.
- [16] Pham T N, Marion M, Denizeau F and Jumarie C. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependent pathways. *Toxicol In Vitro* 2006; 20(8): 1331-42.
- [17] Anthony L, claudie M, nathalie A, olivier F, and laurent V. 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 Biol Med* 2004; 36: 1517-31.
- [18] Montazeri F, Rahgozar S and Ghaedi K. Apoptosis and cytosolic organelles. *Genet in 3rd Millennium* 2011; 9(1): 2300-12.
- [19] Su S-H and Chen H-I. NO signaling in exercise training-induced anti-apoptotic effects in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405: 58-63.
- [20] Mallikarjuna K, Shanmugam K R, Nishanth K, Wu M C, Hou C W, Kuo C H, et al. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione

- family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol* 2010; 44(6): 523-9.
- [21] Falah Hosseini H, Hemati A and Alavian S. A review of herbal medicine: *Silybum marianum*. *J Med Plants* 2004; 3(11): 14-24.
- [22] Ramasamy K and Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett* 2008; 269 (2): 352-62.
- [23] Kasim Z A, Intesar N, Saad H . Dose-dependent anti-inflammatory effect of silymarin in experimental animal model of chronic inflammation. *Afr J Pharm & Pharmacol* 2009; 3(5): 242-47.

## Effect of Endurance Swimming Training and Silymarin Treatment on Changes in Liver Apoptotic Index in Pregnant Rats Exposed to Cadmium

Sh. Mirdar Harijani<sup>1</sup>, N. Musavi<sup>2</sup>, Gh.R. Hamidian<sup>3</sup> H.A. oliaei<sup>4</sup>

Received: 14/12/2013

Sent for Revision: 05/02/2014

Received Revised Manuscript: 03/09/2014

Accepted: 10/09/2014

**Background and Objective:** Abnormal regulation of apoptosis causes progressive pathological processes in the placenta of pregnant women and affects on fetal growth. The aim of this study was to investigate the effects of endurance swimming training and silymarin treatment during pregnancy on cadmium exposure -induced liver apoptotic index in pregnant rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study 72 female rats divided into 9 groups. Training program consisted of endurance swimming, from the first day of pregnancy until delivery. Cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) was given as drinking water (400 mg/kg/l). Silymarin was injected subcutaneously (100 mg/kg) 3 times a week. Apoptotic index was determined by nonradioactive in situ end labeling method using TUNEL immunocytochemical technique. The ANOVA and post hoc LSD (Least Significant Difference) tests were used to analyze the findings of study.

**Results:** Cadmium significantly increased liver apoptotic index ( $p=0.001$ ). Swimming training induced no significant change in liver apoptotic index ( $p=0.424$ ). Swimming training and silymarin treatment significantly decreased liver apoptotic index compared to cadmium ( $p=0.001$ ).

**Conclusion:** Endurance swimming training in combination with silymarin treatment during pregnancy can significantly counteract with cadmium-induced apoptotic index apoptosis in the liver of the pregnant rats.

**Keywords:** Apoptotic index, Pregnant rat, Silymarin, Cadmium, Swimming training

**Funding:** This research was funded by Mazandaran University, Faculty of Physical Education and Sport Sciences.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Mazandaran University, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, approved the study.

**How to cite this article:** Mirdar Harijani Sh, Musavi N, Hamidian GhR, oliaei HA. Effect of Endurance Swimming Training and Silymarin Treatment on Changes in Liver Apoptotic Index in Pregnant Rats Exposed to Cadmium. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 13(8): 705-14. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

(Corresponding Author): Tel: (0112) 5244705, Fax: (0112) 5244705, E-Mail: Shadmehr.mirdar@gmail.com

2- MSc in sport physiology Dept. of Physical Education and Sport Science –Sport physiology, University of Mazandaran, Babilsar, Iran

3- Assistant Prof., of Comparative Histology (Ph.D), Dept. of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine University of Tabriz, Tabriz, Iran

4- MSc in Sport Physiology Physical Education and Sport Science –Sport physiolog., Dept. of Education, Babol, Mazandaran, Babolsar, Iran