



## تأثیر تمرین استقامتی شنا در دوران بارداری بر ساختار بافتی و شاخص آپوتوزی کبد موش‌های صحرائی

شادمهر میردارهریجانی<sup>۱\*</sup>، نرگس موسوی<sup>۱</sup>، غلام‌رضا حمیدیان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر

<sup>۲</sup> گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

(دریافت مقاله: ۹۱/۹/۲۳ - پذیرش مقاله: ۹۲/۷/۲۹)

### چکیده

**زمینه:** پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فعالیت‌های ورزشی موجب القای آپوتوز در بافت‌های مختلف بدن می‌شوند. تنظیم نابهنجار آپوتوز باعث پیشروی فرایندهای پاتولوژیکی در جفت زنان باردار شده و بر رشد جنین تأثیر می‌گذارد. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین استقامتی شنا در طی دوران بارداری بر القای آپوتوز بافت کبد موش‌های صحرائی باردار بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش ۱۶ موش صحرائی باردار با میانگین وزنی  $20 \pm 200$  گرم به دو گروه (گروه کنترل و گروه تمرین) تقسیم شدند. موش‌های صحرائی باردار گروه تمرین از روز اول بارداری تا روز زایمان در استخر ویژه‌ای وادار به شنا شدند. مدت زمان تمرین در روز اول بارداری ۱۰ دقیقه بود که این مدت با افزایش روزانه پنج دقیقه، در هفته دوم به ۶۰ دقیقه رسید. زمان ۶۰ دقیقه تا پایان هفته سوم ادامه داشت. نمونه‌برداری از بافت کبد موش‌های صحرائی روز دوم پس از زایمان انجام و شاخص آپوتوزی کبد با استفاده از تست TUNEL تعیین شد. برای تجزیه و تحلیل یافته‌های این پژوهش از آزمون Independent sample t-test در سطح خطای ( $\alpha \leq 0.05$ ) استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج پژوهش نشان داد که تمرین استقامتی شنا باعث تغییر معناداری در شاخص آپوتوزی کبد نشد ( $P < 0.0004$ ). میانگین شاخص آپوتوزی کبد گروه کنترل برابر با ۷/۴۰ درصد و گروه تمرین شنا ۸/۶۰ درصد بود. اما دوره ۳ هفته‌ای تمرین شنا باعث افزایش کمتری در وزن پس از بارداری موش‌های صحرائی در مقایسه با گروه کنترل شد ( $P < 0.001$ ). به علاوه کاهش معناداری در وزن کبد موش‌های صحرائی گروه تمرین شنا در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ( $P = 0.10$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین استقامتی شنا در طی دوران بارداری تأثیر نگران‌کننده‌ای بر القای آپوتوز کبدی ندارد و می‌تواند در این دوران به‌عنوان یک روش تمرینی ایمن در بهبود کیفیت سلامتی مادر و نوزاد مورد توجه قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** آپوتوز، کبد، تمرین استقامتی شنا، موش صحرائی باردار

\* بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی

## مقدمه

تنظیم آپوپتوز بافت‌ها را تغییر می‌دهد (۵). گزارش شده است که فعالیت ورزشی و امانده‌ساز مصرف اکسیژن را افزایش داده و موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن واکنشی<sup>۳</sup> (ROS) می‌شود. به‌علاوه، تمرینات ورزشی هوای طاق‌فرسا نیز با استرس اکسایشی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در ارتباط است (۶). استرس اکسایشی یکی از چندین مکانیسمی است که باعث القای آپوپتوز می‌شود (۷).

برخی پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند فعالیت ورزشی شدید موجب آپوپتوز لنفوسیت روده‌ای موش آزمایشگاهی می‌شود اما دیدن اختیاری بر روی چرخ‌گردان آپوپتوز را کاهش می‌دهد، در حالی که تمرین ورزشی اجباری سطوح آنتی‌اکسیدان‌های اسپلنوسیت<sup>۴</sup> را افزایش می‌دهد.

نتایج پژوهش هافمن (Hoffman) و همکاران (۲۰۰۹) پیشنهاد می‌کند که فعالیت‌های ورزشی شدید منجر به استرس اکسایشی و القای آپوپتوز می‌گردد (۸). اگر چه پژوهش‌هایی وجود دارند که نشان می‌دهند یک نوبت فعالیت ورزشی ظرفیت اکسایشی کبد را افزایش می‌دهد با این حال گزارش‌هایی هم وجود دارند که نشان می‌دهند یک نوبت شنای و امانده‌ساز منجر به کاهش ظرفیت میتوکندریایی کبد در فسفریلاسیون اکسایشی می‌شود (۹). گزارش شده است که ورزش شنای منظم می‌تواند آسیب اکسایشی به پروتئین‌ها و یا DNA در عضله اسکلتی و مغز موش‌های صحرایی را تضعیف کند. فعالیت ورزشی منظم بر روی نوارگردان نیز استرس اکسایشی را در کبد موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد (۱۰). برطبق یافته‌های شکوهی و همکاران (۲۰۰۸) ورزش هوای طولانی مدت موش‌های ویستار برای ۱۲ ماه آپوپتوز

عملکرد مناسب جفت برای رشد جنین مهم بوده و اختلال آن با ناتوانی‌های رشدی جنین در ارتباط است. آپوپتوز<sup>۱</sup> به‌عنوان فرایند طبیعی مرگ سلولی در انواع سلول‌های تشکیل دهنده اندام‌های جنینی وجود دارد و در فرایندهای فیزیولوژیکی جفت از قبیل نمو، تغییر و تبدیل جنینی و زایمان نقش مهمی ایفا می‌کند. آپوپتوز در جفت در اواسط یا اواخر بارداری‌های انسان و چونندگان به‌طور طبیعی اتفاق می‌افتد. بنابراین سلول‌های جفتی اساساً مستعد آپوپتوز هستند و تنظیم نابهنجار آپوپتوز باعث پیشروی فرایندهای پاتولوژیکی در جفت می‌شود (۱). اما افزایش بیش از حد آپوپتوز با پره‌اکلامپسی (مسمومیت بارداری)<sup>۲</sup> و کندی رشد درون زهدانی در ارتباط است (۲) گفته شده است پره‌اکلامپسی در طی بارداری غالباً کبد را هم درگیر می‌کند (۳).

اجسام آپوپتوزی از جفت وارد گردش خون مادر شده و احتمالاً فاکتور مهمی در توسعه ویژگی‌های بیماری‌های مادری مرتبط با مسمومیت اندوتلیال سیستمیک می‌باشند (۲). از سوی دیگر، اهمیت و فواید فعالیت ورزشی در دوران بارداری اثبات شده است. اثرات مثبت فعالیت ورزشی در طی بارداری شامل آمادگی بدنی بالاتر، تناسب اندام، کاهش حالت افسردگی، افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش پره‌اکلامپسی، کاهش خطر دیابت بارداری، کاهش مصرف سیگار، کاهش ضربان قلب استراحت و غیره می‌باشد (۴). اما برخی شواهد نشان می‌دهند که مرگ سلولی آپوپتوزی با فعالیت ورزشی شدید می‌شود. فعالیت ورزشی شدید و سخت چندین متغیر مؤثر در

<sup>3</sup> Reactive Oxygen Species<sup>4</sup> Splenocyte<sup>1</sup> Apoptosis<sup>2</sup> Preeclampsia

موش‌ها به دو گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه اول شامل موش‌هایی بود که به‌طور طبیعی دوران بارداری خود را طی می‌کردند (گروه کنترل) و گروه دوم موش‌های بارداری که از روز اول بارداری تا روز زایمان در یک دوره برنامه تمرین استقامتی شنا شرکت کردند. اندازه‌گیری وزن موش‌ها در ابتدای ورود به آزمایشگاه و نیز دو روز پس از زایمان انجام شد. کلیه مراحل تمرین و اجرای پژوهش مطابق با دستورالعمل مؤسسه سلامت و تغذیه در مورد مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و کمیته اخلاق دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه مازندران انجام شد.

#### برنامه تمرینی

موش‌های سفید آزمایشگاهی بارداری گروه تمرین یک بار در روز و پنج روز در هفته در استخر ویژه‌ای به ابعاد  $100 \times 50 \times 50$  سانتی‌متر که توسط میردار و همکاران (۲۰۱۲) در دانشکده تربیت بدنی دانشگاه مازندران ساخته شده بود به شنا پرداختند. برنامه اصلی تمرین شنا پس از 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 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 می‌یافت (۱۲).

#### بافت‌برداری و تحلیل آزمایشگاهی

نمونه‌گیری بافتی از کبد موش‌های ماده دو روز پس از زایمان انجام شد. برای این منظور حیوانات با تزریق مخلوط کتامین (۹۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین

سلول‌های شوآن را کاهش داد (۷). سو (Su) و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند مردان سالم پس از ۸ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر روی چرخ کارسنج کاهش آپوتوز نوتروفیلی را نشان دادند که در دوره بی‌تمرینی تا اندازه‌ای به حالت قبل بازگشت (۱۱). علاوه بر این پژوهش کیم (Kim) و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد فعالیت استقامتی بر روی نوارگردان تکثیر سلولی را بدون تغییر آپوتوز در هیپوکامپ افزایش داد (۳). با توجه به مطالب عنوان شده تأثیر فعالیت ورزشی بر القا یا مهار آپوتوز هنوز مورد تردید است. از آنجایی که کبد یکی از مهم‌ترین اندام‌هایی است که تحت تأثیر ورزش قرار می‌گیرد، هدف پژوهش حاضر این است که اثرات سه هفته تمرین شنا استقامتی زیر بیشینه را بر روی شاخص آپوتوزی کبد موش‌های صحرایی بارداری مورد بررسی قرار دهد.

#### مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۱۶ سر موش سفید آزمایشگاهی ماده با میانگین وزنی  $20 \pm 20$  گرم استفاده شد. موش‌ها به همراه آب و غذای کافی در مکانی ویژه با دمای کنترل شده  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت آشنایی با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، حیوانات به استخر شنا منتقل شده و تمرین شنا را به مدت یک هفته انجام می‌دادند به‌طوری که تمرین با ۱۰ دقیقه آغاز و با افزایش پنج 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 داده شدند و پس از ۴۸ ساعت با مشاهده پلاک واژنی بر واژینال، روز اول بارداری مشخص شد (۱۲ و ۱۳). سپس

هیدروژن ۰/۳ درصد 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 POD ساخت شرکت روژ آلمان (کیت شماره ۹۱۰ ۸۱۷ ۶۶۸۴ ۱۱) 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 (x100) به‌طور تصادفی انتخاب شده و هسته‌های TUNEL مثبت (هسته‌هایی به رنگ قهوه‌ای تیره و یکنواخت) و TUNEL منفی مورد شمارش قرار گرفت. سپس شاخص آپوپتوزی<sup>۶</sup> (LI) 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 (۱۵).

### تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از آزمون Independent sample t-test استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS (USA, Il, Chicago, SPSS Inc) و در سطح خطای  $(\alpha \leq 0.05)$  انجام گرفت.

### یافته‌ها

#### وزن بدن و وزن کبد

نتایج به‌دست آمده از تغییرات وزن بدن موش‌های صحرایی دو گروه مبین افزایش کمتر در وزن بدن

(۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس با قیچی سر بریده شدند (۱۴).

برای مطالعه ساختار بافت شناسی، نمونه‌های بافت کبد پس از اندازه‌گیری وزن، به منظور تثبیت در محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی از نمونه‌ها، به‌روش معمول تهیه مقاطع بافتی عمل گردید. در این روش پس از ثبوت، با استفاده از دستگاه هیستوکینت 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) 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. به‌منظور مطالعه تغییرات ساختار بافتی، برش‌های مورد نظر با استفاده از رنگ هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری سه چشمی اولمپوس متصل به دوربین دیجیتال مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

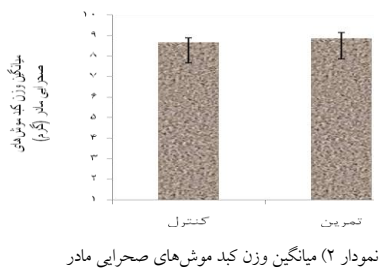
#### تشخیص ایمونوهیستوشیمیایی سلول‌های آپوپتوزی

جهت تشخیص سلول‌های آپوپتوزی، هسته این سلول‌ها با استفاده از روش غیر رادیواکتیو نشان‌دار کردن انتهایی در جای خود<sup>۵</sup> رنگ شده و شناسایی گردید. در این روش، مقاطع تهیه شده به ضخامت ۳ میکرومتر ابتدا با استفاده از دو ظرف گزیلول، پارافین زدایی شده و سپس با غلظت‌های نزولی الکل آب‌دهی شدند و در نهایت سه مرتبه با محلول بافر فسفات عاری از نوکلئاز شستشو شدند. جهت از بین بردن پراکسیدازهای درون‌زاد، مقاطع با پراکسید

<sup>6</sup> Labeling index

<sup>5</sup> In situ end labeling

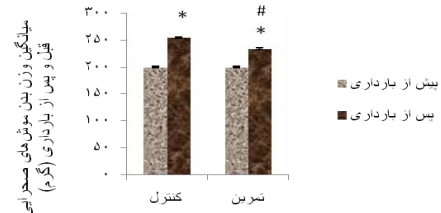
معنی داری را نشان نمی دهد ( $p=1/00$ ) (نمودار ۲).



### بررسی ساختار بافتی و شاخص آپوتوزی کبد

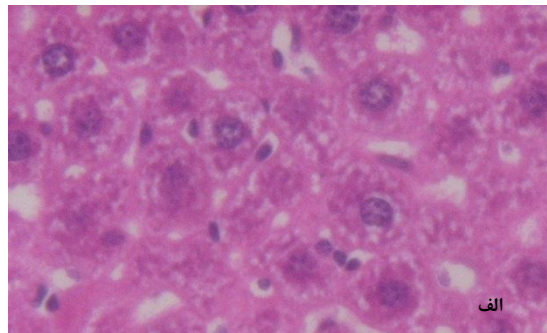
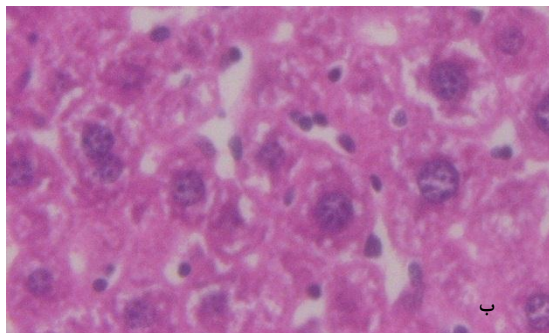
مطالعه ساختار بافتی نشان داد که تمرین استقامتی شنا باعث ایجاد تغییرات ساختاری خاصی در بافت کبد نشد و علی‌رغم افزایش کم فضای سینوزوئیدی، ویژگی‌های مورفولوژی سلول‌های کبدی در طی تمرین هیچ تغییری نسبت به گروه کنترل نشان نداد (شکل ۱).

موش‌های گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل نسبت به پیش از بارداری بود ( $P=1/00$ ) (نمودار ۱).

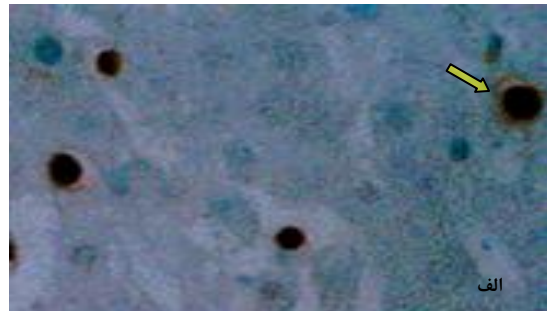
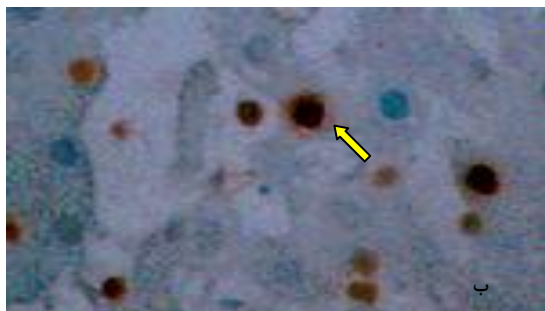


نمودار ۱) میانگین وزن موش های صحرائی مادر

با توجه به وزن اولیه موش‌های صحرائی در ابتدای پژوهش که به طور میانگین  $20 \pm 200$  گرم بود، موش‌های گروه شنا افزایش وزن کمتری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند. همچنین میانگین وزن کبد موش‌های صحرائی گروه تمرین  $8/85$  گرم و میانگین وزن کبد موش‌های صحرائی گروه کنترل  $8/65$  گرم بود که البته تغییر



شکل ۱) مقایسه ساختار بافتی کبد در گروه کنترل (الف) و گروه تمرین (ب) رنگ آمیزی H&E بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰. همان‌گونه که مشاهده می‌شود ساختار بافتی کبد در هر دو گروه کاملاً طبیعی می‌باشد.



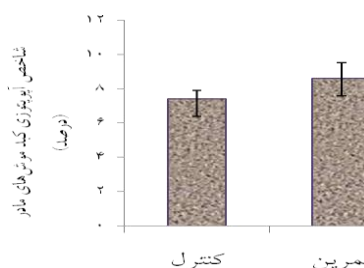
شکل ۲) مقایسه شاخص آپوتوزی کبد در گروه کنترل (الف) و گروه تمرین (ب) با استفاده از تست TUNEL بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تعداد سلول‌های TUNEL مثبت (هسته‌های با رنگ قهوه‌ای تیره که با فلش نشان داده شده است) در گروه تمرین کمی بیشتر است.

می‌کند. لی (Li) و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند ۱۲ هفته تمرین شنای استقامتی، پارامترهای مرتبط با وزن از قبیل کل وزن بدن، وزن چربی و وزن نسبی چربی شکمی و چربی پشتی که در اثر رژیم غذایی پرچرب افزایش می‌یابد را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (۱۷).

بنابراین همان‌طور که در پژوهش حاضر نیز نشان داده شده است، تمرین شنای استقامتی در طی بارداری می‌تواند در کنترل افزایش وزن ناشی از بارداری بسیار مؤثر باشد. زیرا موش‌های باردار گروه تمرین نسبت به پیش از بارداری تنها ۱۷ درصد افزایش وزن داشتند در حالی که گروه کنترل افزایش ۲۷ درصدی را نسبت به پیش از بارداری نشان دادند. همچنین نتایج پژوهش حاضر افزایش غیرمعنی‌دار وزن کبد گروه تمرین را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. پژوهش‌ها افزایش فاکتور رشد سلول کبدی<sup>۷</sup> (HGF) را در طی تمرینات و فعالیت‌های ورزشی مختلف نشان داده‌اند (۱۸) و HGF نقش مهمی در رشد اندام‌های مختلف بدن به‌ویژه بافت کبد دارد (۲۰ و ۲۱).

به‌نظر می‌رسد نوع فعالیت و سطح آمادگی بر ترشح و تعدیل فاکتورهای رشدی تأثیر می‌گذارد (۱۸). همچنین اعتقاد بر این است که یک جلسه فعالیت ورزشی باعث فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای شده و ممکن است هم شامل پاسخ سیستمیک HGF و هم موضعی آن به آسیب ناشی از فعالیت ورزشی باشد (۱۹). هر چند افزایش مشاهده شده در وزن کبد موش‌های گروه تمرین نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود اما همین افزایش اندک را شاید بتوان به افزایش سطح HGF در اثر تمرین شنا نسبت داد.

در بررسی شاخص آپوپتوزی کبد، یافته‌های پژوهش نشان می‌دهد که این شاخص در گروه تمرین استقامتی شنا در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته ولی این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ( $p=0/424$ ). همان‌گونه که شکل ۲ و نمودار ۳ نشان می‌دهد، میانگین شاخص آپوپتوزی کبد در گروه تمرین استقامتی شنا ۶۰ / ۸ درصد و میانگین شاخص آپوپتوزی کبد در گروه کنترل ۴۰ / ۷ درصد بود.



نمودار ۳) میانگین شاخص آپوپتوزی کبد موش‌های صحرایی مادر به درصد

## بحث

هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرینات استقامتی شنا بر القای آپوپتوز کبدی موش‌های صحرایی باردار بود. مقایسه وزن بدن دو گروه افزایش کمتر وزن بدن آزمودنی‌های گروه تمرینی را نشان می‌دهد که مؤید تأثیر مفید برنامه تمرینی اعمال شده می‌باشد که احتمالاً ناشی از مدت و شدت برنامه تمرینی است. تغییرات هورمونی بدن در طی دوران بارداری، و نیز ورزش تنظیم عملکرد متابولیکی و قلبی-عروقی را دگرگون ساخته تا واکنش‌های مادر به‌نحو مطلوبی ادامه یابد. عواملی چون شرایط، شدت و مدت تمرین و مرحله بارداری بر واکنش‌های فیزیولوژیکی به تمرین اثر می‌گذارند. در طی بارداری وزن و هزینه انرژی استراحت به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و هموستاز قلبی-عروقی و تنفسی دچار اختلال می‌شود (۱۶). تمرین بیان ژن مرتبط با متابولیسم را تنظیم

<sup>7</sup> Hepatocyte growth factor

نتایج پژوهش حاضر تفاوت معنی‌دار میانگین شاخص آپوتوزی بافت کبد موش‌های صحرایی باردار گروه تمرین شنا نسبت به گروه کنترل را مورد تأیید قرار نداد. نتایج پژوهش حاضر مؤید یافته‌های پژوهش کیم و همکاران (۲۰۰۲) است در حالی که همسو با یافته‌های هافمن و همکاران (۲۰۰۹) نمی‌باشد. کیم و همکاران دریافتند که فعالیت ورزشی استقامتی با شدت پیشرونده بر روی نوارگردان بدون تغییر در آپوتوز، تکثیر سلولی را در هیپوکامپ افزایش می‌دهد (۵). با اینکه دو الگوی متفاوت اجرای تمرینی در دو پژوهش استفاده شده بود اما به نظر می‌رسد سیستم انرژی استقامتی پژوهش کیم و یافته حاضر ممکن است بتواند توجیه کننده همسویی فقدان اثر آپوتوزی دو پژوهش باشد. مکانیسم عدم بروز آپوتوز در بافت کبد موش‌های صحرایی باردار احتمالاً ناشی از افزایش تدریجی و آرام مدت تمرین شنا و رعایت اصل تحریک و تثبیت در تنظیم برنامه موش‌های صحرایی باردار می‌باشد که طی سازگاری مناسب با آن موجب عدم افزایش تعداد سلول‌های آپوتوزی ناشی از استرس شنا و شدت آن در تحریک آپوتوز گردید.

علاوه بر این توجه به این نکته ضروری است که سرنوشت یک سلول به نسبت درون سلولی نیروی آنتی‌آپوتوزی و پرو‌آپوتوزی آن بستگی دارد. میتوکندری یک اندامک کلیدی در کنترل آپوتوز است و دپولاریزاسیون غشای آن باعث رهائش مولکول‌های پرو‌آپوتوزی می‌شود. پژوهشگران در توجیه کاهش میزان آپوتوز نوتروفیلی در اثر ۸ هفته تمرین بر روی چرخ کارسنج با شدت متوسط پیشنهاد کردند نیتریک اکساید<sup>۸</sup> (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 و بنابراین از آپوتوز جلوگیری می‌کند. انواع مولکول‌های آنتی‌آپوتوزی مستقیم و غیرمستقیم توسط NO تحت تنظیم افزایشی قرار می‌گیرند (۱۱). پروتئین‌های مختلف آنتی‌آپوتوزی درون سلولی مانند نیتریک اکساید سنتاز القایی<sup>۹</sup> (iNOS)، لوسمی سلول میلوئیدی یا مغز استخوانی<sup>۱۰</sup> (Mcl-1)، پروتئین تنظیم شده به وسیله گلوکز<sup>۱۱</sup> (Grp78) و ایتنرلوکین-۸ در طی تمرین بر روی چرخ کارسنج با شدت متوسط تحت تنظیم افزایشی قرار می‌گیرند و پس از بی‌تمرینی نیز در مقادیر بالا باقی می‌مانند. سطوح Mcl-1 به‌عنوان میانجی آنتی‌آپوتوزی سیگنال NO به دلیل تخلیه مولکول اصلی پایین دست سیگنال NO یعنی گوانوزین مونوفسفات حلقوی<sup>۱۲</sup> (cGMP) سقوط می‌کند. به محض فعال‌سازی سیگنال NO-cGMP، نوتروفیل‌ها افزایش بیان Mcl-1 را حفظ کرده و روند آپوتوز را کند می‌سازند.

بنابراین پیشنهاد می‌شود فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط از طریق تنظیم افزایشی مسیر Mcl-1 - NO - cGMP - iNOS روند آپوتوز را کند می‌سازد (۱۱). تفاوت یافته‌های پژوهش حاضر با یافته‌های هافمن و همکاران (۲۰۰۹) را نیز می‌توان به نوع و شدت تمرین به‌کار رفته نسبت داد. یک نوبت فعالیت شدید منجر به تشکیل رادیکال‌های اکسیژنی فراتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن می‌شود که نشانه آن کاهش فعالیت سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز می‌باشد. کاسپاز-۳، پروتئاز عملکردی اصلی در طی مرحله تخریبی آپوتوز می‌باشد. احتمالاً فعالیت

<sup>9</sup> Inducible nitric oxide synthase

<sup>10</sup> Myeloid cell leukemia-1

<sup>11</sup> Glucose-regulated protein 78

<sup>12</sup> c-Guanosine monophosphate

<sup>8</sup> Nitric Oxide

به مدت ۸ هفته، استرس اکسایشی را در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی تضعیف کرده و سرکوب بیان پروتئین P۵۳ در اثر فعالیت استقامتی مذکور ممکن است نقش مهمی در پیشگیری از استرس اکسایشی داشته باشد (۲۴). با وجود تأثیر شرایط نموی بر شاخص‌های هموستازی (۲۵) و نیز تمرینات مقاومتی بر پاسخ‌های التهابی (۲۶) از آنجا که تمرینات ورزشی استقامتی می‌تواند موجب بهبود بیوژنز میتوکندریایی و از سوی دیگر مهار فعال‌سازی کمپلکس‌های مؤثر در ROS میتوکندری کبدی شود (۲۷). می‌توان پیشنهاد کرد تمرین‌شنای استقامتی زیر بیشینه با رعایت اصل تحریک و تثبیت اضافه بار، تولید ROS را مهار کرده و بنابراین دلیلی بر راه‌اندازی مکانیسم‌های جبرانی برای از بین بردن ROS و فعال‌سازی کمپلکس‌هایی که استرس اکسایشی و متعاقباً آپوپتوز را القا می‌کنند وجود نداشته است.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی پیشنهاد می‌شود شنای استقامتی زیر بیشینه با فعال‌سازی مکانیسم‌های تنظیم افزایشی پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی و آنزیم‌های درون‌سلولی، آپوپتوز را به تعویق می‌اندازد. با وجود مخاطرات احتمالی تمرینات ورزشی در دوران بارداری به‌نظر می‌رسد تمرین‌شنای استقامتی با شدت متوسط با رعایت اصل تحریک و تثبیت اضافه بار، موجب القای آپوپتوز کبدی نمی‌شود و می‌تواند بدون نگرانی در سلامت مادر و نوزاد مورد توجه قرار گیرد. هر چند محقق پژوهش‌های بیشتری را به‌ویژه در نمونه‌های انسانی توصیه می‌کند.

ورزشی شدید، همان‌طور که در لنفوسیت موش‌های تمرین‌نکرده مشاهده شده، با تأثیر بر فعالیت کاسپاز-۳ یک واکنش بیولوژیکی واقعی را نمایان می‌کند (۸). کبد یک اندام کلیدی در فیزیولوژی ورزشی محسوب می‌شود. آپوپتوز کبدی موش‌های صحرایی باردار در طی دوران بارداری فعالیت کاسپاز-۳ در بخش‌های سیتوزولیک کبد جنین را افزایش می‌دهد (۲۲). همچنین بیان نسبی Bax- $\alpha$  و Bcl-۲ نیز افزایش می‌یابد (۲۳). از سوی دیگر کاهش سطوح اکسیژن موجب ایجاد اختلال در عملکرد دستگاه‌هایی می‌شود که به حضور اکسیژن وابسته‌اند و اگر هایپوکسی خیلی شدید باشد می‌تواند موجب مرگ سلول شود. فاکتور القایی هایپوکسی (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ) (HIF-1 $\alpha$ )، فاکتور رونویسی اصلی است که مسئول القای ژن‌های ویژه در شرایط هایپوکسی بوده و توسط سایتوکین‌ها، هورمون‌ها و NO فعال می‌شود. هایپوکسی با کاهش نسبت پروتئین‌های پروآپوپتوزی Bax/Bcl-۲ انباشته، از آپوپتوز جلوگیری و رهایش سیتوکروم C و فعالیت کاسپاز-۳ را مهار می‌کند. در همین راستا میرداد و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که سطوح HIF-1 $\alpha$  ریه نوزادان دو روزه موش‌های صحرایی باردار در پی تمرینات استقامتی شنای زیر بیشینه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۱۲). همچنین یافته‌ها نشان می‌دهند که پروتئین P۵۳ فاکتور القایی اصلی در آپوپتوز وابسته به میتوکندری است و انتقال آن به درون میتوکندری در آپوپتوز ناشی از ROS مهم است. در این رابطه کی (Qi) و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند فعالیت استقامتی بر روی نوارگردان با شدت ۲۰ متر بر دقیقه به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در روز و

### References:

1. Yamauchi H, Katayama KI, Ueno M, et al. Essential role of p53 in trophoblastic apoptosis

induced in the developing rodent placenta by treatment with a DNA-damaging agent. Apoptosis

- 2007; 12: 1743-54.
2. Charles AK, Hisheh S, Liu D, et al. The expression of apoptosis related genes in the first trimester human placenta using a short term in vitro model. *Apoptosis* 2005; 10: 135-40.
  3. Bacq Y. Liver diseases unique to pregnancy: a 2010 update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35: 182-93.
  4. Field T. Prenatal exercise research. *Infant Behav Dev* 2012; 35: 397-407.
  5. Kim SH, Kim HB, Jang MH, et al. Treadmill exercise increases cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. *Life Sci* 2002; 71: 1331-40.
  6. Minatoa KI, Miyaka Y, Fukumoto S, et al. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci* 2003; 72: 1609-16.
  7. Shokouhi G, Tubbs RS, Mohammadali M, et al. The effects of aerobic exercise training on the age-related lipid peroxidation Schwann cell apoptosis and ultrastructural changes in the sciatic nerve of rats. *Life Sci* 2008; 82: 840-6.
  8. Hoffman-Goetz L, Pervaiz N, Guan J. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF-alpha in intestinal lymphocytes. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 498-506.
  9. Terblanche SE, Gohil K, Packer L, et al. The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 128: 889-96.
  10. Nakamoto H, Kaneko T, Tahara S, et al. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Exp Gerontol* 2007; 42: 287-95.
  11. Su SH, Jen CJ, Chen HI. NO signaling in exercise training-induced anti-apoptotic effects in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405: 58-63.
  12. Mirdar Sh, Arab A, Hedayati M, et al., The effect of pregnant rat swimming on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  levels of neonatal lung. *TUMJ* 2012; 69: 754-60.
  13. Koumentaki A, Anthony F, Poston L, et al. Low-protein diet impairs vascular relaxation in virgin and pregnant rats. *Clin Sci* 2002; 102: 553-60.
  14. Durigan JL, Peviani SM, Russo TL, et al. Effects of exercise training on atrophy gene expression in skeletal muscle of mice with chronic allergic lung inflammation. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42: 339-45.
  15. Melen-Mucha G, Balcerczak E, Mucha S, et al. Expression of p65 gene in experimental colon cancer under the influence of 5-fluorouracil given alone and in combination with hormonal modulation. *Neoplasma* 2003; 51: 319-24.
  16. O'Toole M.L. Physiologic aspects of exercise in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2003; 46: 379-89.
  17. Lee KY, Kim SJ, Cha YS, et al. Effect of exercise on hepatic gene expression in an obese mouse model using cDNA microarrays. *Obesity* 2012; 14: 1294-302.
  18. Morici G, Zangla D, Santoro A, et al. Supramaximal exercise mobilizes hematopoietic progenitors and reticulocytes in athletes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R1496-503.
  19. O'Reilly C, McKay B, Phillips S, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) and the satellite cell response following muscle lengthening contractions in humans. *Muscle Nerve* 2008; 38: 1434-42.
  20. Bahadori MH, Azarnia M, Ghasemian F. The effect of hepatocyte growth factor on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development. *ZJRMS* 2011; 13: 26-30.
  21. Spijkers JA, van den Hoff MJ, Hakvoort T, et al. Foetal rise in hepatic enzymes follows decline in c-met and hepatocyte growth factor expression. *J Hepatol* 2001; 34: 699-710.
  22. Abdel-Naim AB, Nagy AA, Mohamadin AM, et al. Chloroacetonitrile induces oxidative stress and apoptosis in mouse fetal liver. *Toxicol Lett* 2009; 190: 123-7.
  23. Perez MJ, Macias RI, Duran C, et al. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 2005; 43: 324-32.
  24. Qi Z, He J, Zhang Y, et al. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic. *Free Radic Biol Med* 2011; 50: 794-800.
  25. MirdarHarijani S, Nejabat M, Hajizadeh Moghadam A. Effect of one session endurance exhausting exercise on some coagulation markers of mature and immature wistar rats. *ISMJ* 2013; 16 :80-91.
  26. Jafari A, Zarghami Khameneh A, Akhtari Shojaei E. The effect of different caffeine doses on acute inflammatory response following one-session exhaustive resistance training in male volleyball players. *ISMJ* 2014; 17: 847-59.
  27. Sun L, Shen W, Liu Z, et al. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sci* 2010; 86: 39-44.

*Original Article*

## Effect of endurance swimming training during pregnancy on histology and apoptotic index of rats' liver

Sh. Mirdar Harijani <sup>1\*</sup>, N. Musavi <sup>1</sup>, Gh.Hamidian <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and sport sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

<sup>2</sup> Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received 13 Dec, 2012      Accepted 21 Oct, 2013)

**Background:** The studies have reported that exercise induced apoptosis in various tissues. The abnormal regulation of apoptosis contributes to the progression of pathological processes in the placenta and effects on embryo development. The aim of the present study was to investigate the effect of swimming endurance training during pregnancy on apoptosis induction in pregnant rats' liver.

**Materials and Methods:** Sixteen female Wistar rats with an average weight of  $200 \pm 20$  grams were divided into two groups: swimming and control. The rats of training group were forced from first day of pregnancy to delivery in a particular pool. The time of training in first day of pregnancy was 10 min and this time in second week reached to 60 min by increasing of 5 min per day. The time of 60 min continued to end of third week. The sampling of the rats' liver was performed two days after delivery and the liver apoptotic index was determined with TUNEL technique. Statistical analysis of the data was done using independent t-test ( $\alpha \leq 0.05$ ).

**Results:** The results of study showed that swimming endurance training did not induce significant change in liver apoptosis ( $p < 0.424$ ). The mean of apoptosis in control and training groups was %7.40 and %8.60 respectively. But 3-wk period of swimming training induced significantly minor increase in the amount of post pregnancy weight gain compared to the control group ( $p < 0.001$ ). In addition, it was observed non-significant decrease in weight of training groups rat's liver compared to the control group ( $p = 1.00$ ).

**Conclusion:** It seems that endurance swimming training during pregnancy has no anguishing effect on apoptosis induction in liver and it is considered as safe exercise way in the improvement of mother and infant health.

**Key words:** liver, apoptosis, endurance swimming training, pregnant rat.

\*Address for correspondence: Babolsar, University of Mazandaran, Department of Exercise Physiology; E-mail shadmehr.mirdar@gmail.com