

## اثر هشت هفته تمرین هوازی همراه با مکمل کورکومین بر آپوپتوز کبد موش‌های صحرایی در معرض کادمیوم

شقایق عالیشان<sup>۱</sup>، علیرضا براری<sup>۲</sup>، احمد عبدی<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** قرارگیری در معرض فلزات سنگین مانند کادمیوم (Cd)، یکی از عوامل مهم آسیب‌کبدی با فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز است. فعالیت‌بدنی منظم و استفاده از ترکیبات طبیعی، می‌تواند در کاهش اثرات سمی این فلز نقش داشته باشند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر تمرین هوازی همراه با مکمل کورکومین بر آپوپتوز کبدی موش‌های صحرایی در معرض Cd بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به پنج گروه مساوی دریافت کادمیوم (Cd)، کادمیوم+دریافت کورکومین (Cd+Cu)، کادمیوم+تمرین (Cd+AT) و دریافت کادمیوم+کورکومین+تمرین (Cd+Cu+AT) تقسیم شدند. گروه‌های دریافت‌کننده Cd، روزانه ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن Cd دریافت کردند. تمرین هوازی شامل دویدن روی نوارگردان با شدت متوسط، به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته اجرا شد. گروه‌های کورکومین نیز روزانه ۱۶۰ میکرولیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن کورکومین دریافت کردند. بیان ژن‌ها به روش RT-PCR اندازه‌گیری شد. مقایسه‌های بین گروهی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی انجام شد.

**یافته‌ها:** قرار گرفتن در معرض کادمیوم باعث افزایش معنی‌دار بیان BAX، نسبت BAX/BCL2 و سطح CASPASE-3، در کنار کاهش معنی‌دار BCL2، در مقایسه با C شد ( $P = 0/0001$ ). بیان CASPASE-3 در گروه‌های Cd+AT ( $P = 0/023$ ) و Cd+Cu ( $P = 0/30$ ) نسبت به C افزایش معنی‌داری داشت. در مقابل BAX، نسبت BAX/BCL2 و CASPASE-3 در گروه‌های Cd+Cu (به ترتیب  $P = 0/013$ ،  $P = 0/0001$  و  $P = 0/045$ )، Cd+AT (به ترتیب  $P = 0/003$ ،  $P = 0/0001$  و  $P = 0/035$ ) و Cd+Cu+AT ( $P = 0/0001$ ) نسبت به Cd کاهش معنی‌داری داشت. گروه Cd+Cu+AT کاهش معنی‌داری در CASPASE-3 نسبت به گروه Cd+Cu ( $P = 0/014$ ) و Cd+AT ( $P = 0/019$ ) نشان داد. علاوه بر این، بیان BCL2 در گروه‌های Cd+Cu ( $P = 0/013$ )، Cd+AT ( $P = 0/006$ ) و Cd+Cu+AT ( $P = 0/0001$ ) نسبت به Cd؛ و Cd+Cu+AT نسبت به گروه Cd+Cu ( $P = 0/010$ ) و Cd+AT ( $P = 0/021$ ) افزایش معنی‌داری داشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان‌دهنده‌ی نقش محافظتی تمرین هوازی و کورکومین در برابر سمیت Cd از طریق تنظیم مسیرهای مولکولی مرتبط با آپوپتوز است. ترکیب این دو مداخله، اثر هم‌افزایی در کاهش آسیب سلولی نشان داد و می‌تواند به عنوان رویکردی مؤثر در مقابله با آسیب‌های کبدی ناشی از فلزات سنگین پیشنهاد شود.

**واژگان کلیدی:** کادمیوم؛ تمرین هوازی؛ کورکومین؛ آپوپتوز؛ کبد

**ارجاع:** عالیشان شقایق، براری علیرضا، عبدی احمد. اثر هشت هفته تمرین هوازی همراه با مکمل کورکومین بر آپوپتوز کبد موش‌های صحرایی در

معرض کادمیوم. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۴۷): ۱۹۷۸ – ۱۹۸۶.

## مقدمه

عنوان اولین دسته از عوامل سرطان‌زاها معرفی کرده است (۲). کلیه، کبد، عضلات اسکلتی و سیستم عصبی اندام‌های هدف اصلی به دنبال مواجهه مزمن با کادمیوم هستند که باعث ایجاد آسیب‌هایی در این اندام‌ها می‌شود. با این حال، مکانیزم دقیق آسیب ناشی از کادمیوم نامشخص است. پس از جذب، کادمیوم با اتصال به آلبومین در سراسر بدن توسط گردش خون توزیع می‌شود (۳). کادمیوم، موقعیت اتصال یون‌های فلزی مانند یون‌های کلسیم، آهن و روی را بر روی

بیماری‌های ناشی از کادمیوم، به دلیل افزایش استفاده از کادمیوم در صنعت و کشاورزی و قرار گرفتن در محیط‌های آلوده رو به افزایش بوده و به یکی از مشکلات جهانی تبدیل شده است. برخلاف آلاینده‌های آلی، تجزیه کادمیوم توسط میکروارگانیسم‌ها به سختی انجام می‌شود و به طور کامل توسط بدن دفع نمی‌شود (۱). سازمان بین‌المللی تحقیقات سرطان، کادمیوم و ترکیبات مرتبط با آن را به

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علیرضا براری؛ دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران

فاکتور هسته‌ای کاپا B را که مسئول تنظیم رونویسی ژن‌هایی است که التهاب، رشد سلول‌های ایمنی و مرگ سلولی را کنترل می‌کنند، مهار کرده و از انتشار ایترولوکین-6 و ایترولوکین-8 در پاسخ به یون‌های سمی کادمیوم جلوگیری کرد (۲۴). به نظر می‌رسد تمرین ورزشی و کورکومین قادر است بر مسیر آپوپتوز تاثیر داشته باشد. با این وجود اثر همزمان تمرین و همین طور مکمل بر آپوپتوز سلولی موش‌های در معرض کادمیوم کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. در محدود مطالعاتی که انجام شد، نتایج حاکی از این بود که شش هفته تمرین هوازی و مصرف نانوکورکومین باعث بهبود عوامل ایجاد کننده آپوپتوز در کبد موش‌ها شده است (۲۵).

با توجه به محدودیت پژوهشی در خصوص اثر همزمان تمرین هوازی و کورکومین بر مسیرهای آپوپتوز در موش‌های در معرض کادمیوم، فرض ما این بود که اثر همزمان تمرین و مکمل بهتر از اثر هر کدام به تنهایی می‌باشد. لذا در این پژوهش سعی شده تا به این سوال پاسخ داده شود که؛ هشت هفته تمرین هوازی همراه با مکمل کورکومین چه اثری بر عوامل مؤثر بر آپوپتوز کبد موش‌های صحرایی در معرض کادمیوم دارد؟

## روش‌ها

### نمونه‌های پژوهش

مطالعه‌ی حاضر با توجه به ماهیت و روش اجرای آن در زمره تحقیقات آزمایشگاهی و تجربی است. در این پژوهش همه‌ی آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به سیاست‌های مربوط به حمایت از حیوانات (بر اساس خط‌مشی‌های قرارداد هلسینگی) انجام شد و قوانین راهنمای مؤسسه ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. پروتکل مطالعه‌ی توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی (IR.IAU.AMOL.REC.1403.175) تأیید شد.

### حیوانات

تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر سن ۸-۱۰ هفته‌ای با نژاد ویستار و میانگین وزن تقریبی ۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم از مؤسسه پاستور تهیه شد و به آزمایشگاه حیوانی دانشگاه ساری منتقل شدند. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معناداری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵ درصد (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم‌افزار G-Power (۸ سر در هر گروه) تعیین شد. دمای محیط  $22 \pm 3$  درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت بود. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه موش جدید (پس از یک هفته)، موش‌ها به طور تصادفی به گروه‌های هشت‌تایی شامل کنترل (C)، دریافت کادمیوم (Cd)، کادمیوم+دریافت

پروتئین‌های انتقال غشاء تغییر می‌دهد تا نفوذپذیری غشای سلولی را تغییر داده و ورود این یون‌ها را به سلول‌ها افزایش دهد (۴). همچنین کادمیوم از طریق مکانیزم‌های مختلفی از جمله ایجاد استرس اکسیداتیو، آسیب DNA، استرس شبکه آندوپلاسمی، آپوپتوز و اتوفازی باعث آسیب سلولی می‌شود (۵، ۶).

Men و همکاران نشان دادند که قرار گرفتن موش‌ها در اوایل دوره‌ی زندگی در معرض کادمیوم منجر به ایجاد تومورهای کبدی و اندازه‌ی بزرگتر کبد در ادامه‌ی دوره زندگی خواهد شد (۷).

همچنین Barsouk و همکاران اظهار داشتند که کادمیوم بیشتر در اندام‌هایی مانند کبد ذخیره شده و خطر ابتلا به سرطان کبد را افزایش می‌دهد (۸). هیستوپاتولوژی نشان می‌دهد که کادمیوم می‌تواند باعث آسیب حاد کبدی شده و منجر به نکروز بافتی، آپوپتوز، هیپرپلازی و بزرگ شدن سینوس کبد شود (۹). برخی مطالعات نقش مسیرهای میتوکندری را در القای آپوپتوز ناشی از کادمیوم از طریق اختلال در تنظیم BCL-2، سییتوکروم c، TNF- $\alpha$  و افزایش در فعالیت CASPASE-3، 7 نشان دادند (۱۰، ۱۱). همچنین ممکن است مسیر CASPASE-3، 8 و p53 با مسیرهای درونی و بیرونی آپوپتوز ناشی از کادمیوم تعامل داشته باشد (۱۲).

به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی می‌تواند اثرات کادمیوم را بر مسیرهای آپوپتوز بهبود ببخشد. در پژوهشی نشان داده شد که هشت هفته تمرین استقامتی بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax را در بافت قلب موش‌های در معرض کادمیوم بهبود بخشید (۱۳). همچنین در مطالعه‌ی دیگری روی موش‌های که تمرین شنای استقامتی را انجام داده بودند مشاهده شد که تمرین ورزشی باعث کاهش فاکتورهای القاکننده آپوپتوز در بافت کبد موش‌های دریافت‌کننده کادمیوم شد (۱۴). مطالعه‌ی دیگری نیز نشان داد فعالیت ورزشی بر بیان ژن‌های BCL2، BAX و CASPASE-3 که نقش مهمی در آپوپتوز، تأثیر دارد (۱۵). از سوی دیگر، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، به طور گسترده‌ای برای جلوگیری از آسیب ناشی از کادمیوم استفاده شده است (۱۶). کورکومین (CUR) (Curcumin) یک ترکیب پلی‌فنولی آبگریز است که از ریزوم زردچوبه (خانواده: Zingiberaceae) استخراج می‌شود (۱۷). CUR اغلب به‌عنوان فعال‌ترین جزء طبیعی در میان سایر ترکیبات موجود در گیاه در نظر گرفته می‌شود که حدود ۲ تا ۸ درصد از اکثر فرمولاسیون‌های زردچوبه را شامل می‌شود (۱۸). تحقیقات زیادی CUR را به عنوان یک عامل محافظتی در برابر سرطان مورد مطالعه قرار داده‌اند (۱۹، ۲۰). علاوه بر اثرات دارویی، CUR می‌تواند یون‌های فلزی را از بدن حذف کرده (۲۱) و اثرات نامطلوب کادمیوم را کاهش دهد (۲۲). تجویز خوراکی CUR باعث کاهش تجمع عناصر سمی در مغز و کبد در موش شد (۲۳). همچنین CUR بیان

## روش های آزمایشگاهی

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) حیوانات با استفاده از کلروفورم بی هوش و قربانی شدند. بافت کبد بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالیین فوراً در تیوب های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان اندازه گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تاثیر آهنگ شبانه روزی، نمونه گیری از ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید.

## طراحی و آماده سازی پرایمر

ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

## انجام Real time-PCR

۲۰ میلی گرم از بافت کبد با استفاده از اسکالپر خرد و در میکروتیوب هموژنیزه شد. سپس با استفاده از محلول تیاژول، RNA کل سلول ها استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA از طریق اسپکتروفوتومتری NanoDrop ارزیابی شد. برای سنتز cDNA، ۱ میکروگرم RNA کل با RNase-free DNase I (Promega, USA) برای حذف آلودگی DNA ژنومی تیمار، سپس با هگزامرهای تصادفی و آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA) معکوس رونویسی شد (طبق پروتکل سازنده). qRT-PCR با SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, USA) روی دستگاه StepOnePlus (Applied Biosystems, USA) انجام شد. پرایمرها (جدول ۱) برای BAX, BCL2, CASPASE-3 و ژن مرجع GAPDH طراحی شدند. پروتکل حرارتی: دناتوراسیون اولیه ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل شامل ۹۵°C (۲۰ ثانیه)، ۶۰°C (۳۰ ثانیه) و ۷۲°C (۷۰ ثانیه). بیان نسبی ژن ها با روش  $\Delta\Delta Ct$  محاسبه شد:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{GAPDH (reference)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

پس از تأیید توزیع طبیعی داده ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و برابری واریانس ها توسط آزمون Leven، برای تجزیه و تحلیل آماری از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. (version 26, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد و سطح معنی داری آزمون ها  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

کورکومین (Cd+Cu)، کادمیوم+تمرین (Cd+AT) و دریافت کادمیوم+کورکومین+تمرین (Cd+Cu+AT) قرار گرفتند.

## نحوه القای کادمیوم

کلرید کادمیوم (CdCl<sub>2</sub>؛ سیگما-آلد ریچ، ایالات متحده آمریکا) به عنوان منبع کادمیوم استفاده شد. بر اساس تعداد و وزن بدن موش ها، CdCl<sub>2</sub> در آب آشامیدنی گروه های دریافت کننده کادمیوم حل شد. موش های گروه های در معرض کادمیوم، ۵ میلی گرم بر کیلوگرم در روز کادمیوم را از طریق آب آشامیدنی در طول مداخله هشت هفته ای دریافت کردند، دوزی که قبلاً نشان داده شده است باعث سمیت کبدی و استرس ER بدون ایجاد مرگ و میر بیش از حد می شود. میزان مصرف آب و توده ی بدن به صورت هفتگی بررسی شد تا از پایداری میزان مواجهه با کادمیوم نسبت به وزن بدن اطمینان حاصل شود (۲۶).

## پروتکل تمرین

موش های صحرایی به مدت یک هفته با نوار گردان ویژه موش های صحرایی و تمرینات ورزشی آشنا شدند. آشنا سازی بدین صورت است که موش های صحرایی به یک هفته، روزانه ۱۰ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه روی نوارگردان بدون شیب دویدند. در ادامه موش های صحرایی روزانه ۳۰ تا ۶۰ دقیقه با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در شیب ۱۵ درجه دویدند. تمرینات برای مدت هشت هفته و هفته ای پنج جلسه انجام می شود. همچنین برای رعایت اصل اضافه بار، تمرینات در هفته اول تا چهارم ۳۰ دقیقه و از هفته چهارم تا هشتم زمان به ۶۰ دقیقه رسید (۲۷) (جدول ۱).

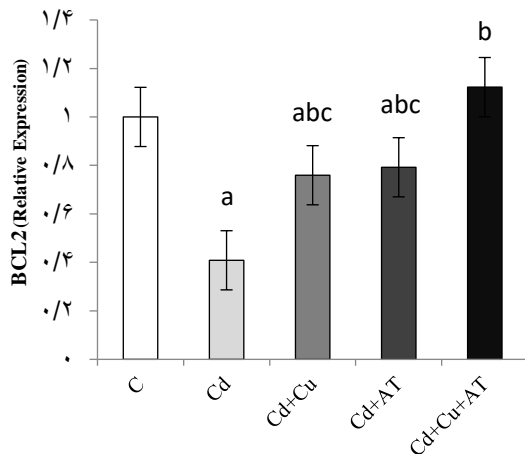
جدول ۱. پروتکل تمرین

هفته	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
زمان (دقیقه)	۶۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۵	۲۰	۱۵
سرعت (متر بر دقیقه)				۱۵				
شیب (درجه)					۱۵			

## مکمل دهی کورکومین

کورکومین (سیگما-آلد ریچ، ایالات متحده آمریکا) با حل کردن این ترکیب در محلول دکستروز بلافاصله قبل از تجویز تهیه شد. موش های صحرایی در گروه های Cd+Cu و Cd+Cu+AT، ۱۶۰ میکرولیتر بر کیلوگرم در روز محلول کورکومین را از طریق گاواژ دهانی در طول مداخله هشت هفته ای دریافت کردند (۲۸). موش های صحرایی دیگر گروه ها حجم معادلی از دکستروز را برای کنترل استرس ناشی از گاواژ دریافت کردند.

تغییرات BCL2 در گروه Cd ( $P = 0/0001$ ) نسبت به C نشان داد. همچنین افزایش معنی‌داری در گروه‌های Cd+Cu ( $P = 0/013$ ), Cd+AT ( $P = 0/006$ ) و Cd+Cu+AT ( $P = 0/0001$ ) نسبت به Cd؛ و Cd+Cu+AT نسبت به گروه Cd+Cu ( $P = 0/010$ ) و Cd+AT ( $P = 0/021$ ) مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. تغییرات بیان BCL2 بافت کبد در گروه‌های مختلف با آزمون

آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $P < 0/05$ ).

a تفاوت با گروه C، b تفاوت با گروه Cd، c تفاوت با Cd+Cu+AT. C: کنترل، Cd: کادمیوم، Cd+Cu: کادمیوم+کورکومین، Cd+AT: کادمیوم+تمرین و Cd+Cu+AT: کادمیوم+کورکومین+تمرین.

از دیگر نتایج پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات BAX/BCL2 بافت کبد بین گروه‌های مختلف بود ( $P = 0/0001$ ). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد افزایش معنی‌داری در میزان تغییرات BAX/BCL2 در گروه Cd ( $P = 0/0001$ ) نسبت به C وجود دارد. همچنین کاهش معنی‌داری در گروه‌های Cd+Cu ( $P = 0/0001$ )، Cd+AT ( $P = 0/0001$ ) و Cd+Cu+AT ( $P = 0/0001$ ) نسبت به Cd مشاهده شد (شکل ۳).

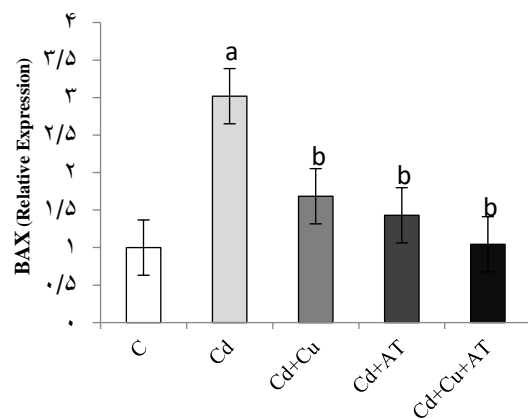
در نهایت، تحلیل داده‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان CASPASE-3 بافت کبد بین گروه‌های مختلف بود ( $P = 0/0001$ ). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد افزایش معنی‌داری در میزان تغییرات CASPASE-3 در گروه‌های Cd ( $P = 0/0001$ )، Cd+Cu ( $P = 0/023$ ) و Cd+AT ( $P = 0/30$ ) نسبت به C وجود دارد. همچنین کاهش معنی‌داری در گروه‌های Cd+Cu ( $P = 0/045$ )، Cd+AT ( $P = 0/035$ ) و Cd+Cu+AT ( $P = 0/0001$ ) نسبت به Cd؛ و Cd+Cu+AT نسبت به گروه Cd+Cu ( $P = 0/014$ ) و Cd+AT ( $P = 0/019$ ) مشاهده شد (شکل ۴).

جدول ۲. توالی پرایمرها

Genes	Primers (5'-3')	Product lengths (bp)
BAX	Forward 5'-GCTGCAGAGGATGATTGCTG-3'	150
	Reverse 5'-CCAGTTGAAGTTGCCGTCTAG-3'	
BCL2	Forward 5'-CTGCACCTGACGCCCTTAC-3'	180
	Reverse 5'-GGCCATATAGITCCACAAAGG C-3'	
CASPASE-3	Forward 5'-ATGAGGACATGAAAAATACCG AGT-3'	120
	Reverse 5'-CTTCTGGTACAGCTCTTGGT-3'	
GAPDH	Forward 5'-GGTAGTGAAGGCTGCTGCTGAT G-3'	200
	Reverse 5'-AGTCCACAACACGGTTGCTGTA TC-3'	

### یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان BAX بافت کبد بین گروه‌های مختلف وجود دارد ( $F = 9/403$ ,  $P = 0/0001$ ). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد افزایش معنی‌داری در میزان تغییرات BAX در گروه Cd ( $p = 0/0001$ ) نسبت به C وجود دارد. همچنین کاهش معنی‌داری در گروه‌های Cd+Cu ( $P = 0/013$ )، Cd+AT ( $P = 0/003$ ) و Cd+Cu+AT ( $P = 0/0001$ ) نسبت به Cd مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات بیان BAX بافت کبد در گروه‌های مختلف با آزمون

آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $P < 0/05$ ).

a تفاوت با گروه C، b تفاوت با گروه Cd، c تفاوت با Cd+Cu+AT. C: کنترل، Cd: کادمیوم، Cd+Cu: کادمیوم+کورکومین، Cd+AT: کادمیوم+تمرین و Cd+Cu+AT: کادمیوم+کورکومین+تمرین.

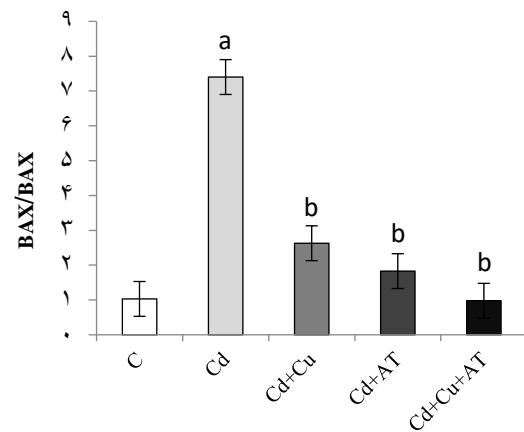
همچنین تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان BCL2 بافت کبد بین گروه‌های مختلف نشان داد ( $P = 0/0001$ ). نتایج آزمون تعقیبی Tukey کاهش معنی‌داری در میزان

پیش آپوپتوز) و BCL2 (ضد آپوپتوز) و اجزای مسیر میتوکندریایی مانند c, cytochrome c, Apaf-1 و CASPASE تنظیم می‌شود (۳۲، ۳۳). CASPASEها، به ویژه CASPASE-3، مجریان اصلی آپوپتوز هستند که در پایین دست تغییرات میتوکندریایی که اغلب تحت تأثیر نسبت BAX/BCL2 قرار دارند، فعال می‌شوند (۳۴-۳۶).

یافته‌های مطالعه حاضر که بر پایه اندازه‌گیری بیان ژن (mRNA) استوار است، نشان می‌دهد که تجویز Cd به تنهایی این تعادل را در بافت کبد به طور قابل توجهی مختل می‌کند، که با افزایش بیان ژن‌های BAX و CASPASE-3 و افزایش نسبت BAX/BCL2، در کنار کاهش بیان BCL2 کبدی در مقایسه با گروه کنترل سالم، مشهود است. این یافته با مطالعات موجود که نشان می‌دهند قرار گرفتن در معرض Cd با تغییر نسبت BAX/BCL2 به سمت آپوپتوز و فعال کردن CASPASEها، آپوپتوز را افزایش می‌دهد، همسو است (۲۹، ۳۴، ۳۵). به عنوان مثال، مطالعات نشان داده‌اند که Cd باعث افزایش بیان BAX و کاهش بیان BCL2 در بافت کبد می‌شود و به آپوپتوز سلول‌های کبدی کمک می‌کند (۲۹-۳۱). این تغییر پیش آپوپتوز اغلب از طریق مسیرهای میتوکندریایی انجام می‌شود، جایی که BAX می‌تواند آزادسازی سیتوکروم c را افزایش دهد و متعاقباً CASPASE-3 را فعال کند (۳۲، ۳۴، ۳۶). با این حال، استنتاج عملکردی قطعی از فعال‌سازی آپوپتوز نیازمند تأیید سطح پروتئین مانند cleaved caspase-3 یا آزمون‌های عملکردی مانند TUNEL است، که در این مطالعه انجام نشده است.

در پژوهش حاضر، اثرات کاهش‌دهنده مشاهده‌شده کورکومین (Cu) و تمرین هوایی (AT) بر آپوپتوز ناشی از Cd قابل توجه است. هر دو مداخله، هنگامی که با کادمیوم تجویز شدند (گروه‌های Cd+Cu، Cd+AT)، منجر به کاهش قابل توجه تغییرات در بیان BAX کبدی، نسبت BAX/BCL2 و سطح CASPASE-3 شدند، در حالی که بیان BCL2 کبدی را افزایش دادند و در نتیجه اثرات پیش‌آپوپتوزی Cd را خنثی کردند. کورکومین، یک ترکیب پلی‌فنلی طبیعی مشتق شده از زردچوبه، به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی خود به خوبی مستند شده است (۳۷-۳۹). نشان داده شده است که با کاهش تنظیم پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مانند BAX و افزایش تنظیم پروتئین‌های ضدآپوپتوزی مانند BCL2، از آپوپتوز جلوگیری می‌کند (۳۷، ۳۹). به عنوان مثال، مشخص شد که درمان با کورکومین، فعال‌سازی CASPASE-3 را مهار کرده و نسبت BAX/BCL2 را در مدل‌های مختلف سلولی کاهش می‌دهد (۳۷، ۳۹).

تمرین هوایی (AT) همچنین به دلیل اثرات محافظتی خود در برابر عوامل استرس‌زای مختلف، اغلب با تقویت مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی و تعدیل پاسخ‌های التهابی شناخته شده است (۱۵).



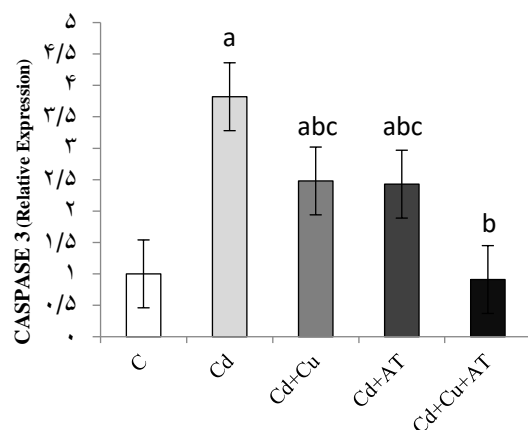
شکل ۳. تغییرات BAX/BCL2 بافت کبد در گروه‌های مختلف با آزمون

آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $P < 0.05$ ).

a تفاوت با گروه C، b تفاوت با گروه Cd، c تفاوت با Cd+Cu+AT.

C: کنترل، Cd: کادمیوم، Cd+Cu: کادمیوم+کورکومین، Cd+AT: کادمیوم+تمرین و

Cd+Cu+AT: کادمیوم+کورکومین+تمرین.



شکل ۴. تغییرات بیان CASPASE 3 بافت کبد در گروه‌های مختلف با

آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $P < 0.05$ ).

a تفاوت با گروه C، b تفاوت با گروه Cd، c تفاوت با Cd+Cu+AT.

C: کنترل، Cd: کادمیوم، Cd+Cu: کادمیوم+کورکومین، Cd+AT: کادمیوم+تمرین و

Cd+Cu+AT: کادمیوم+کورکومین+تمرین.

## بحث

قرار گرفتن در معرض کادمیوم (Cd) خطر زیست‌محیطی قابل توجه بوده که باعث ایجاد مسمومیت در سیستم‌های مختلف بدن می‌شود و کبد به دلیل نقش در سم‌زدایی، یکی از بافت‌های اصلی اثر Cd است (۲۹، ۳۰). مکانیسم کلیدی سمیت کبدی ناشی از Cd، فعال شدن آپوپتوز، یک مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است (۲۹، ۳۱). این فرایند به شدت توسط تعادل ظریف بین پروتئین‌های پیش‌آپوپتوز و ضد آپوپتوز، به ویژه اعضای خانواده Bcl-2، از جمله BAX

TUNEL، عدم تحلیل فاکتوریل برای تعاملات، و بررسی محدود مسیر آپوپتوز بدون اجزای کلیدی میتوکندریایی مانند Apaf-1 و cyt-c است. علاوه بر این، فقدان داده‌های تجربی در مورد اتوفازی، هرگونه فرضیه در این زمینه را متفی می‌کند. همچنین مدل‌های حیوانی ترجمه به محیط بالینی انسان را به درستی منعکس نمی‌کنند و پاسخ انسانی به کادمیوم مزمن یا کورکومین و تمرین هوازی با آن‌ها هم‌خوانی ندارد.

### نتیجه‌گیری

این یافته‌ها تأثیر قابل توجه کادمیوم بر آپوپتوز بافت کبد را برجسته می‌کنند که با تغییر نامطلوب در تعادل BAX/BCL2 و افزایش فعالیت CASPASE-3 مشخص می‌شود. نکته مهم این است که هم کورکومین و هم تمرین هوازی به صورت جداگانه اثرات محافظتی نشان می‌دهند، اما ترکیب آنها نتیجه درمانی بهتری به همراه دارد. این نشان می‌دهد که یک رویکرد چندوجهی که ترکیبات طبیعی را با مداخلات سبک زندگی ترکیب می‌کند، می‌تواند در کاهش آسیب اندام ناشی از فلزات سنگین بسیار مؤثر باشد. تحقیقات آینده باید عمیق‌تر به مکانیسم‌های مولکولی دقیق زیربنایی این هم‌افزایی پردازند، به ویژه بررسی کنند که چگونه مداخله ترکیبی بر یکپارچگی میتوکندری، استرس شبکه آندوپلاسمی و تعامل پیچیده بین آپوپتوز و اتوفازی در زمینه سمیت Cd تأثیر می‌گذارد. چنین تحقیقاتی می‌تواند راه را برای استراتژی‌های درمانی جدید در برابر قرار گرفتن در معرض سموم محیطی هموار کند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری رشته‌ی فیزیولوژی ورزش با کد ۱۶۲۹۶۸۹۸۲ می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی به تصویب رسیده و با حمایت مالی شخصی به انجام رسیده است. بدین وسیله از زحمات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی تقدیر و تشکر می‌شود.

نشان داده شده است که فعالیت ورزشی بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، از جمله BCL2، BAX و CASPASE-3 تأثیر می‌گذارد (۱۵). نشان داده شده که تمرین هوازی نیز بیان ژن‌های آپوپتوزی را در مدل‌های استرس کبدی تعدیل می‌کند (۴۰). با این وجود، فقدان مطالعات مستقیم بر آپوپتوز کبدی ناشی از Cd، تفسیر را به شواهد غیرمستقیم محدود می‌کند.

یکی از نتایج قلیل توجه، افزایش اثر محافظتی در گروه مداخله‌ی ترکیبی (Cd+Cu+AT) است. کاهش قابل توجه CASPASE-3 در این گروه در مقایسه با هر دو گروه Cd+AT و Cd+Cu، همراه با افزایش قابل توجه BCL2 کبدی در مقایسه با هر دو گروه درمانی به تنهایی، نشان‌دهنده‌ی اثر ترکیبی بیشتر است. این اثر احتمالاً از تعدیل همزمان استرس اکسیداتیو و مسیرهای آپوپتوز ناشی می‌شود (۴۱). تعدیل مستقیم مسیرهای آپوپتوز توسط کورکومین، همراه با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن، می‌تواند مزایای سیستمیک فعالیت ورزشی را که شامل بهبود تعادل ردوکس، کاهش التهاب و افزایش مکانیسم‌های ترمیم سلولی است، تکمیل کند (۳۸، ۳۹). بنابراین، این ترکیب ممکن است با پرداختن همزمان به استرس اکسیداتیو، التهاب و مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز، یک استراتژی محافظتی جامع‌تر در برابر سمیت کبدی ناشی از کادمیوم ارائه دهد (۲۹، ۳۹).

تعامل بین اتوفازی و آپوپتوز نیز یک ملاحظه حیاتی است. اتوفازی، یک فرآیند خود تخریبی سلولی، بسته به زمینه و شدت استرس می‌تواند آپوپتوز را تقویت یا مهار کند (۳۲). برخی شواهد نشان می‌دهد که اتوفازی بیش از حد می‌تواند منجر به مرگ سلولی آپوپتوز شود، در حالی که در موارد دیگر، اتوفازی می‌تواند مانع فرآیند آپوپتوز شود (۳۲). با توجه به اینکه هم کورکومین و هم فعالیت ورزشی می‌توانند بر وضعیت متابولیک سلولی و پاسخ‌های استرس تأثیر بگذارند، این احتمال وجود دارد که عملکرد ترکیبی آنها همچنین تداخل بین اتوفازی و آپوپتوز را تعدیل کند و بیشتر به محافظت کبدی مشاهده شده کمک کند (۳۹).

از محدودیت‌های این پژوهش، تمرکز بر بیان mRNA بدون اندازه‌گیری پروتئین یا فعالیت مانند cleaved caspase-3

### References

1. Kubier A, Wilkin RT, Pichler T. Cadmium in soils and groundwater: a review. *Appl Geochem* 2019; 108: 104388.
2. Mulware SJ. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech* 2013; 3(2): 85-96.
3. Vacchi-Suzzi C, Kruse D, Harrington J, Levine K, Meliker JR. Is urinary cadmium a biomarker of long-term exposure in humans? A review. *Curr Environ Health Rep* 2016; 3(4): 450-8.
4. Dalton TP, He L, Wang B, Miller ML, Jin L, Stringer KF, et al. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(9): 3401-6.
5. Gao M, Li C, Xu M, Liu Y, Cong M, Liu S. LncRNA MT1DP aggravates cadmium-induced oxidative stress by repressing the function of Nrf2 and is dependent on interaction with miR-365. *Adv Sci (Weinh)* 2018; 5(7): 1800087.

6. Ma Y, Su Q, Yue C, Zou H, Zhu J, Zhao H, et al. The effect of oxidative stress-induced autophagy by cadmium exposure in kidney, liver, and bone damage, and neurotoxicity. *Int J Mol Sci* 2022; 23(21): 13491.
7. Men H, Young JL, Zhou W, Zhang H, Wang X, Xu J, et al. Early-life exposure to low-dose cadmium accelerates diethylnitrosamine and diet-induced liver cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 1427787.
8. Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Rawla P, Barsouk A. Chemical risk factors of primary liver cancer: an update. *Hepat Med* 2021; 12: 179-88.
9. Tzirogiannis KN, Panoutsopoulos GI, Demonakou MD, Papadimas GK, Kondyli VG, Kourentzi KT, et al. The hepatoprotective effect of putrescine against cadmium-induced acute liver injury. *Arch Toxicol* 2004; 78(6): 321-9.
10. Bhardwaj JK, Panchal H, Saraf P. Cadmium as a testicular toxicant: A review. *J Appl Toxicol* 2021; 41(1): 105-17.
11. Amanpour P, Khodarahmi P, Salehipour M. Protective effects of vitamin E on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2020; 393(3): 349-58.
12. Xu Y-R, Yang W-X. Roles of three Es-Caspases during spermatogenesis and Cadmium-induced apoptosis in *Eriocheir sinensis*. *Aging (Albany NY)* 2018; 10(5): 1146.
13. Ghajari H, Hosseini SA, Farsi S. The effect of endurance training along with cadmium consumption on Bcl-2 and bax gene expressions in heart tissue of rats. *Ann Mil Health Sci Res* 2019; 17(1): e86795.
14. Mirdar Harijani S, Musavi N, Hamidian GR. Effect of endurance swimming training and silymarin treatment on changes in liver apoptotic index in pregnant rats exposed to cadmium [in Persian]. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2015; 13(8): 705-14.
15. Ramezani S, Peeri M, Azarbaijani MA, Dehghan FJJoPSoBiS. Effects of aerobic exercise and vitamin D supplementation on the expression of apoptosis genes BCL2, BAX, Caspase3 and BCL2/BAX ratio on lung in male rats exposed to hydrogen peroxide [in Persian]. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport* 2020; 8(16): 86-100.
16. Branca JJ, Carrino D, Paternostro F, Morucci G, Fiorillo C, Nicoletti C, et al. The Protection of Zinc against Acute Cadmium Exposure: A Morphological and Molecular Study on a BBB In Vitro Model. *Cells* 2022; 11(10): 1646.
17. Gera M, Sharma N, Ghosh M, Lee SJ, Min T, Kwon T, et al. Nanoformulations of curcumin: An emerging paradigm for improved remedial application. *Oncotarget* 2017; 8(39): 66680.
18. Zhou H, S Beevers C, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets* 2011; 12(3): 332-47.
19. Rahmani AH, Al Zohairy MA, Aly SM, Khan MA. Curcumin: a potential candidate in prevention of cancer via modulation of molecular pathways. *Biomed Res Int* 2014; 2014.
20. Howells LM, Iwuji CO, Irving GR, Barber S, Walter H, Sidat Z, et al. Curcumin combined with FOLFOX chemotherapy is safe and tolerable in patients with metastatic colorectal cancer in a randomized phase IIa trial. *J Nutr* 2019; 149(7): 1133-9.
21. Qayoom A, Kazmi SA, Ali SN. Turmeric powder as a natural heavy metal chelating agent: Surface characterisation. *Pakistan Journal of Scientific & Industrial Research Series A: Physical Sciences* 2017; 60(1): 1-8.
22. Mehmood S, Saeed DA, Rizwan M, Khan MN, Aziz O, Bashir S, et al. Impact of different amendments on biochemical responses of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants grown in lead-cadmium contaminated soil. *Plant Physiol Biochem* 2018; 132: 345-55.
23. Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J. Comparative study of natural antioxidants—curcumin, resveratrol and melatonin—in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology* 2006; 225(2-3): 150-6.
24. Rennolds J, Malireddy S, Hassan F, Tridandapani S, Parinandi N, Boyaka PN, et al. Curcumin regulates airway epithelial cell cytokine responses to the pollutant cadmium. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417(1): 256-61.
25. Sadat-Hoseini SK, Roshan VD. The interactive effects of two forced and voluntary exercise training method and Nanocurcumin supplement on doxorubicin-induced hepatotoxicity in aging induced by D-galactose [in Persian]. *Tehran Univ Med J* 2017; 74(11): 807-16.
26. Ojo OA, Rotimi DE, Ojo AB, Ogunlakin AD, Ajiboye BO. Gallic acid abates cadmium chloride toxicity via alteration of neurotransmitters and modulation of inflammatory markers in Wistar rats. *Sci Rep* 2023; 13(1): 1577.
27. McCullough DJ, Nguyen LM-D, Siemann DW, Behnke BJ. Effects of exercise training on tumor hypoxia and vascular function in the rodent preclinical orthotopic prostate cancer model. *J Appl Physiol* (1985) 2013; 115(12): 1846-54.
28. Fleet JC, Kovalenko PL, Li Y, Smolinski J, Spees C, Yu J-G, et al. Vitamin D signaling suppresses early prostate carcinogenesis in TgAPT121 mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2019; 12(6): 343-56.
29. Gelen V, Sengul E, Yildirim S, Cinar İ. The role of GRP78/ATF6/IRE1 and caspase-3/Bax/Bcl2 signaling pathways in the protective effects of gallic acid against cadmium-induced liver damage in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2023; 26(11): 1326-33.
30. Ding L, Zhu H, Wang K, Huang R, Yu W, Yan B, et al. Quercetin alleviates cadmium-induced BRL-3A cell apoptosis by inhibiting oxidative stress and the PERK/IRE1 $\alpha$ /ATF6 signaling pathway. *Environ Sci Pollut Res Int* 2023; 30(60): 125790-805.
31. Rahmani Talatappeh N, Ranji N, Beigi Harchegani AJAoE, Health O. The effect of N-acetyl cysteine on oxidative stress and apoptosis in the liver tissue of rats exposed to cadmium. *Arch Environ Occup Health* 2021; 76(8): 518-25.
32. Biswas U, Roy R, Ghosh S, Chakrabarti GJCI. The interplay between autophagy and apoptosis: its implication in lung cancer and therapeutics. *Cancer Lett* 2024; 585: 216662.
33. Thévenod F, Lee W-KJCFitte. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. *Met Ions Life Sci* 2012; 11: 415-90.
34. Nemati S, Zavvari-Oskuye Z, Bafadam S, Mokhtari B, Badalzadeh R, Vakili AJEG. Impact of combined

- alpha-lipoic acid and mitoquinone supplementation on myocardial infarction in aged rats: Heart performance and molecular mechanisms. *Exp Gerontol* 2024; 189: 112402.
35. Jantalika T, Manochantr S, Kheolamai P, Tantikanlayaporn D, Saijuntha W, Pinlaor S, et al. Human chorion-derived mesenchymal stem cells suppress JAK2/STAT3 signaling and induce apoptosis of cholangiocarcinoma cell lines. *Sci Rep* 2022; 12(1): 11341.
36. Yuan P, Feng A, Wei Y, Li S, Fu Y, Wang X, et al. Indole-3-carboxaldehyde alleviates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by improving mitochondrial dysfunction via PKA activation. *Food Chem Toxicol* 2024; 186: 114546.
37. Wahyudi LD, Yu SH, Cho MKJLS. The effect of curcumin on the cadmium-induced mitochondrial apoptosis pathway by metallothionein 2A regulation. *Life Sci* 2022; 310: 121076.
38. Tarasub N, Junseecha T, Tarasub C, Ayutthaya WDN. Protective effects of curcumin, vitamin C, or their combination on cadmium-induced hepatotoxicity. *J Basic Clin Pharm* 2012; 3(2): 273-81.
39. Subramaniyan V, Lubau NSA, Mukerjee N, Kumarasamy VJTR. Alcohol-induced liver injury in signalling pathways and curcumin's therapeutic potential. *Toxicol Rep* 2023; 11: 355-67.
40. Wang J, Li Y, Jiang C, Li J. [Effect of aerobic exercise on AKT/GSK3 $\beta$  mediated hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease]. [in Chinese] *Wei Sheng Yan Jiu* 2023; 52(2): 246-52.
41. Thévenod F, Lee W-KJAot. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch Toxicol* 2013; 87(10): 1743-86.

## The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercise Combined with Curcumin Supplementation on Liver Apoptosis in Cadmium-Exposed Rats

Shaghayegh Alishan<sup>1</sup>, Alireza Barari<sup>2</sup>, Ahmad Abdi<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Exposure to heavy metals such as cadmium (Cd) is a major contributor to liver damage, primarily through the activation of apoptotic pathways. Regular physical activity and the use of natural compounds may mitigate the toxic effects of Cd. This study aimed to investigate the effect of aerobic exercise combined with curcumin supplementation on liver apoptosis in Cd-exposed rats.

**Methods:** In this experimental study, 40 male Wistar rats were randomly assigned to five equal groups: Control, Cd, Cd + Curcumin (Cd+Cu), Cd + Aerobic Training (Cd+AT), and Cd + Curcumin + Aerobic Training (Cd+Cu+AT). The Cd groups received 5 mg/kg body weight of cadmium daily via drinking water. Aerobic training consisted of treadmill running at moderate intensity, five sessions per week for eight weeks. The curcumin groups received 160 µL/kg body weight of curcumin orally on a daily basis. Gene expression was measured by RT-PCR. Inter-group comparisons were conducted using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.

**Findings:** Cd exposure induced significant elevations in BAX expression, BAX/BCL2 ratio, and CASPASE-3 levels, alongside a significant reduction in BCL2, compared to the C group ( $p=0.0001$ ). CASPASE-3 expression was also significantly upregulated in the Cd+Cu ( $p=0.023$ ) and Cd+AT ( $p=0.30$ ) groups relative to C. In contrast, BAX, BAX/BCL2 ratio, and CASPASE-3 were significantly reduced in the Cd+Cu ( $p=0.013$ ,  $p=0.0001$  and  $p=0.045$ , respectively), Cd+AT ( $p=0.003$ ,  $p=0.0001$  and  $p=0.035$ , respectively) and Cd+Cu+AT ( $p=0.0001$ ) groups compared to Cd. The Cd+Cu+AT group further exhibited a significant decrease in CASPASE-3 relative to Cd+Cu ( $p=0.014$ ) and Cd+AT groups ( $p=0.019$ ). In addition, BCL2 expression was significantly increased in the Cd+Cu ( $p=0.013$ ), Cd+AT ( $p=0.006$ ), and Cd+Cu+AT ( $p=0.0001$ ) groups compared to Cd; and Cd+Cu+AT compared to the Cd+Cu ( $p=0.010$ ) and Cd+AT ( $p=0.021$ ) groups.

**Conclusion:** These findings highlight the protective role of aerobic exercise and curcumin against Cd-induced hepatotoxicity through modulation of apoptotic molecular pathways. Their combination demonstrated a synergistic effect in reducing liver cell damage and may serve as an effective strategy against heavy metal-induced hepatic injury.

**Keywords:** Cadmium, Aerobic Training, Curcumin, Apoptosis, Liver

**Citation:** Alishan Sh, Barari A, Abdi A. **The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercise Combined with Curcumin Supplementation on Liver Apoptosis in Cadmium-Exposed Rats.** J Isfahan Med Sch 2026; 43(847): 1978- 86.

1- PhD Student, Department of Exercise Physiology, Am.C., Islamic Azad University, Amol, Iran

2- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Am.C., Islamic Azad University, Amol, Iran

**Corresponding Author:** Alireza Barari, Department of Physical Education and Sport Science, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran; Email: alireza.barari@iau.ac.ir