

## اثرات تمرین تناوبی شدید و مصرف کورکومین بر ظرفیت تام ضداکسایشی و مقدار GRP78

## و کاسپاز ۳ هیپوکامپ موشهای صحرایی نر تحت مواجهه با آرسنیک

عبدالله حسینیلو<sup>۱</sup>، رقیه پوزش جدیدی<sup>۲</sup>، جبار بشیری<sup>۳</sup>، میرعلی رضا نورآذر<sup>۴</sup>، کریم آزاللی علمداری<sup>۵</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** اطلاعات زیادی در مورد تاثیر توأم تمرین و کورکومین در شرایط مواجهه با آرسنیک بر مغز وجود ندارد. در این تحقیق تاثیر شش هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف کورکومین بر مقدار ظرفیت تام ضداکسایشی، GRP78 و کاسپاز ۳ هیپوکامپ موشهای صحرایی در معرض آرسنیک بررسی شد. **مواد و روشها:** تعداد ۴۸ سر رت نر به شش گروه شامل تمرین، کورکومین، تمرین و کورکومین، آرسنیک، کنترل اتانول و کنترل آب مقطر تقسیم شدند. آرسنیک به مدت شش هفته روزانه از طریق آب آشامیدنی با دوز ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و کورکومین روزانه ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی استفاده شد. پروتکل تمرین ورزشی با شدت بالا به مدت شش هفته (۵ روز در هفته) شامل ۶۰ دقیقه دویدن تناوبی (۴ دقیقه دویدن با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO2max و ۲ دقیقه ریکاوری فعال با شدت ۶۰-۵۰ درصد) انجام شد. **یافته‌ها:** مواجهه با آرسنیک از طریق آب آشامیدنی سبب افزایش معنی‌دار مقدار کاسپاز ۳ ( $P=0/001$ ) و GRP78 ( $P=0/001$ ) و کاهش غیرمعنی‌دار ظرفیت تام ضداکسایشی ( $P=0/95$ ) هیپوکامپ شد. اگرچه تمرین هم باعث افزایش معنی‌دار کاسپاز ۳ هیپوکامپ شد ( $P=0/001$ )، ولی فقط کورکومین قادر به جبران تغییرات کاسپاز ۳ ( $P=0/001$ ) و ظرفیت تام ضداکسایشی ( $P=0/001$ ) ناشی از آرسنیک بود. **نتیجه گیری:** مواجهه با آرسنیک هیپوکامپ مغز را در معرض استرس اکسایشی و آپوپتوز قرار می‌دهد و با وجود آثار محافظتی قابل ملاحظه کورکومین، تمرین تناوبی شدید قابلیت جبران آثار سوء آرسنیک در مغز را ندارد.

**واژه‌های کلیدی:** آرسنیک، هیپوکامپ، تمرین تناوبی شدید، کورکومین، مرگ سلولی

۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲ استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳ دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۴ استادیار، گروه دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۵ دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، نویسنده مسئول: k.azali@azaruniv.ac.ir

## مقدمه

آرسنیک یک آلاینده زیست محیطی بدون مزه و بوی موجود در آب است که از سد خونی مغزی عبور کرده و افراد را در نارسایی‌های شناختی، رفتاری و خلقی قرار می‌دهد. مواجهه طولانی مدت با آرسنیک با بیماری آلزایمر مرتبط است و در مغز سبب التهاب عصبی و آپوپتوز نموده و همچنین با آپوپتوز ناشی از استرس شبکه اندوپلاسمی نیز همراه می‌شود (۱). استرس شبکه اندوپلاسمی سبب آغاز مسیرهای پیام‌رسانی شامل مسیر  $PERK^1$  تنظیم شونده با RNA و  $eIF2\alpha$  کیناز می‌شود که ممکن است سبب فعال‌سازی پروتئین GRP78 (مارکر شبکه اندوپلاسمی) شود. GRP78 هم می‌تواند از تجمع پروتئین‌ها جلوگیری کرده و در تاخوردن پروتئین‌ها مشارکت کند. ولی استرس مداوم و بیش از حد شبکه اندوپلاسمی ممکن است که از طریق فعال‌سازی CHOP و کاسپاز ۱۲ سبب القای آپوپتوز شود (۲). ولی اگرچه آرسنیک اثرات نروتوکسیک خود را در پستانداران القاء می‌کند، ولی مکانیسم‌های نروتوکسیسیته ناشی از آرسنیک منجر شونده به استرس شبکه اندوپلاسمی به‌ویژه در هیپوکامپ، هنوز به خوبی روشن نشده‌اند.

از سوئی، کاهش ظرفیت شناختی و افزایش استعداد به نارسایی‌های تحلیل نرونی (به ویژه در سالمندی) از بر هم خوردن تعادل بیان سیتوکین‌های پیش التهابی و ضدالتهابی در مغز روی می‌دهد و نقش تمرین ورزشی در کاهش نارسایی‌های مربوط به التهاب عصبی تایید شده است (۳). حتی در مدل‌های حیوانی سالم و آلزایمری هم تاثیر ضد التهاب نرونی ورزش به ویژه در هیپوکامپ و افزایش قدرت حافظه به واسطه تمرین بدنی (۴) تایید شده است. به علاوه، ورزش عوامل خطر پیرامونی از قبیل دیابت، فشار خون و بیماری‌های قلبی عروقی اثرگذار بر نارسایی عملکردی مغز و تحلیل عصبی را کاهش می‌دهد و حتی تاثیر تمرین هوازی شدید هم بر ساختار، متابولیسم و پاسخ التهابی هیپوکامپ افراد جوان سالم تایید شده است (۵). به علاوه، تمرین اینتروال شدید هم بر دستکاری استرس اکسایشی در هیپوکامپ، BDNF و شاخص‌های التهابی موثر است (۶). همچنین، تمرین دویدن از طریق کاهش فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی پاسخ پروتئین تانخورده (UPR)، سبب کاهش مرگ سلولی و التهاب ناشی از استرس شبکه اندوپلاسمی در مغز می‌شود (۷). اما با اینکه کاهش التهاب در CNS در جمعیت انسانی و مدل‌های حیوانی به عنوان عامل اصلی محافظت از تحلیل عصبی ناشی از هر نوع ورزش شناخته شده است، ولی هنوز در مورد پارامترهای مربوط به تاثیر ورزش بر بیماری‌های تحلیل عصبی مانند شدت ورزش هنوز باید تحقیقات بیشتری صورت گیرد.

از سوئی میل ترکیبی آرسنیک برای اتصال به گروه‌های سولفوهدریل (قوی‌ترین آنتی‌اکسیدانهای سطحی سلولی) (۸) سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. به دلیل اینکه مغز مقدار زیادی از لیپیدها و فلزات اکسید شده را دارا است و همچنین نسبت به سایر بافتها مکانیسم‌های ضد اکسایشی ضعیف‌تری دارد، بنابراین بروز استرس اکسایشی در مغز راحت‌تر است (۹). در این بین کورکومین (دی فریولومتان) یک پلی‌فنول طبیعی ضد اکسایشی در این زمینه توجه زیادی به خود جلب کرده است. شواهد زیادی اثرات ضد اکسایشی، ضدسرطانی و ضدالتهابی کورکومین را در خیلی از مدل‌های سلولی و حیوانی درگیر نارسایی‌های مختلف تایید کرده‌اند. طبق یک مطالعه مروری بسیار جدید در چندین مدل سلولی تحلیل عصبی، کورکومین در دامنه‌ای از دوزهای مورد مصرف و مدت مواجهه با سموم مختلف و حتی مستقل از زمان مصرف آن (قبل، در حین و یا بعد از مواجهه با سموم) اثر ضد اکسایشی داشته است (۱۰). کورکومین از طریق کاهش MDA و کربونیل‌های پروتئین، تیولها و نیترو تیروزین‌ها

<sup>1</sup> Protein kinase-like ER kinase

از اکسایش چربی و پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین از آسیب کنترل نشده DNA از طریق تحریک مسیرهای Akt و MAPK جلوگیری می‌کند. به علاوه، فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی مانند SOD، CAT، GPx، GST، GR و iNOS تحت تاثیر کورکومین قرار می‌گیرند. شواهدی هم وجود دارد که کورکومین از مهار Nrf2 و جابجایی NFκB از سیتوزول به هسته و تجزیه IκB جلوگیری می‌کند که همه این فرایندها در تنظیم فعالیت ضد اکسایشی در بدن نقش دارند (۱۰).

ولی تاکنون تاثیر کورکومین بر اصلاح اثرات منفی ناشی از آرسنیک بر مغز فقط در یک تحقیق نشان شده است که در آن سمیت عصبی آرسنیک توسط کورکومین از طریق دستکاری استرس اکسایشی و آمین‌ها (NO) بهبود یافت (۱۱). ولی هنوز برای تایید کارایی کورکومین در انسانها نیاز به تحقیقات بیشتر باقی است (۱۲). در مورد تمرین هوازی و کورکومین نیز در یک تحقیق تاثیر دریافت کورکومین و تمرین هوازی به دنبال دریافت استات سرب بررسی شد که تمرین هوازی، مصرف کورکومین و اثر توام هر دو منجر به کاهش معنی‌دار MDA در هیپوکامپ و پلازما و افزایش ذخایر تام آنتی‌اکسیدانی پلازما شدند (۱۳). بنابراین به دلیل کمبود اطلاعات، هنوز برای بررسی کارایی کورکومین و تمرین بدنی در برابر اثر سمی آرسنیک بر مغز و به ویژه استرس اکسایشی نیاز به تحقیقات بیشتر باقی است. بنابراین به نظر می‌رسد که بررسی مستقیم چگونگی نقش کورکومین در جمعیت افراد در حال تمرین بدنی (چه ورزشکاران و چه بیماران در حال ورزش درمانی) بر اثرات سمی آرسنیک در مغز و به ویژه مقدار مرگ سلولی از طریق دستکاری وضعیت استرس اکسایشی به عنوان اصلی‌ترین مسیر دستکاری تحلیل عصبی مغز ناشی از آرسنیک در این زمینه اهمیت کاربردی و ویژه‌ای داشته و زمینه ساز انجام تحقیقات بیشتر در آینده باشد. به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری مقدار کاسپاز ۳ مغزی و به ویژه هیپوکامپ که مسئول حافظه و یادگیری است، به دلیل انعکاس دادن فعال سازی غیرقابل برگشت آپوپتوز، سلولهای عصبی منجر شونده به تحلیل عصبی (۱۴) می‌تواند در تعیین نوع مرگ سلولی ناشی از مواجهه با آرسنیک نیز کمک کننده باشد.

## روش پژوهش

نوع پژوهش در مطالعه حاضر، از لحاظ هدف بنیادی و روش پژوهش از نوع تجربی بود. تعداد ۴۸ سر رت نژاد ویستار شش هفته‌ای آزمودنیهای مطالعه حاضر بودند. در مدت اجرای مداخله‌های تمرینی و جراحی، تعداد سه سر رت در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و بسته‌های غذایی و طبق چرخه‌ی ۱۲ ساعت خواب و بیداری نگهداری شدند. درجه حرارت اتاق، در محدوده  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد حفظ شد و شرایط نگهداری و کار با حیوانات براساس توصیه‌های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت.

**طرح تحقیق:** رت‌ها ابتدا به شش گروه هشت تایی شامل تمرین، کورکومین، تمرین و کورکومین، آرسنیک، کنترل اتانول و کنترل آب مقطر تقسیم شدند. چهار گروه از کل رت‌ها شامل گروه‌های تمرین، مکمل کورکومین، تمرین و مکمل و آرسنیک به مدت شش هفته از طریق آب آشامیدنی تحت مواجهه با آرسنیک تری اکسید با دوز (۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حل شده در ۴ میلی لیتر آب مقطر در روز) قرار گرفتند که هر روز دو بار (که در هر وهله نصف دوز مصرف شد) گاوژ شد (۱۵). به دلیل اینکه کورکومین در اتانول حل گردید، بنابراین برای تعیین اثر اتانول، گروه اتانول کنترل نیز در نظر گرفته شد. کورکومین روزانه ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۱۶) به صورت حل شده در ۴ میلی لیتر آب مقطر) در طی دو وهله (که در هر وهله نصف دوز مصرف شد) گاوژ شد. در همه جلسات آرسنیک یک ساعت پس از کورکومین مصرف شد.

پروتکل تمرین با شدت بالا شامل ۶۰ دقیقه دویدن تناوبی روی تردمیل بدون شیب با تکرار ۵ روز در هفته و به مدت ۶ هفته بود. هر تناوب شامل ۴ دقیقه با شدت ۹۰-۸۵ درصد  $VO_{2max}$  و ۲ دقیقه ریکاوری فعال با شدت ۶۰-۵۰ درصد  $VO_{2max}$  بود. رت‌ها قبل شروع فاز اصلی تمرین، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵ متر در دقیقه، گرم کردند. سرعت دویدن هر هفته به تدریج به میزان ۰/۰۲ متر در ثانیه افزایش یافت.

**استخراج و تهیه نمونه بافتی:** پس از پایان مداخله ابتدا رت‌ها با مخلوط کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. پس از شکافتن سر، مغز استخراج و با سالین سرد ۹ درصد، از خون پاکسازی شد. هیپوکامپ نیمکره راست برای تثبیت در پارافورمالدهید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار غرق و در ادامه پس از قرار دادن قطعات تثبیت شده در داخل پارافین، توسط میکروتوم به تکه‌های کوچکتر با ضخامت ۷ میکرومتر بریده شدند. در ضمن هیپوکامپ نیمکره چپ نیز بلافاصله پس از استخراج در نیتروژن مایع منجمد شده و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان تحلیل نگهداری شد.

**روش اندازه‌گیری متغیرها:** اندازه‌گیری ظرفیت تام ضد اکسایشی نمونه‌های هموزن هیپوکامپ چپ به روش DCPIP انجام شد. اندازه‌گیری GRP78 بافتی نیز با استفاده قطعات پارافینی هیپوکامپ طبق روش ایمنوهِستوشیمی و کاملاً مطابق با جزئیات روش (۱) انجام شد. بدین منظور قطعات پارافینی از داخل گزین و اتانول عبور داده شدند و سپس با هیدروژن پراکسید ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه بلوک شدند. در ادامه قطعات در معرض بافر اسیدسیتریک (pH=۶) قرار گرفته و سپس به مدت دو ساعت با BSA پنج درصد بلوک شدند. سپس قطعات در طول شب با آنتی بادی GRP78 در دمای ۴ درجه انکوبه شدند (1:50, sc-37676, Santa Cruz, CA, USA). سپس قطعات با محلول ویژه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و سپس برای رنگ آمیزی با کیت رنگ آمیزی DAB (Boster Biotechnology, China) انکوبه شده و سپس هماتوکسلین طبق دستورالعمل اضافه شد. سپس تصاویر قطعات با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر توسط نرم افزار Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) کمی سازی شدند.

همچنین بروز آپوپتوز از طریق اندازه‌گیری مقدار کاسپاز ۳ به عنوان پروتئین عملگر نهایی آپوپتوز بررسی شد. بدین منظور برای استخراج پروتئین‌ها از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی‌مولار بافر تریس (PH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، ۱٪ SDS به اضافه ۰/۱ درصد آنتی پروتئاز کوکتیل (ROCHE) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز توسط یک هموزنایزر دستی هموزن شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند و سپس در یک سانتریفوژ یخچال‌دار (bo, sw14rfroil) در دور ۱۲۰۰۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده پروتئین (Bio-Rad) اندازه‌گیری گردید (در طول موج ۵۹۵ نانومتر). در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر درجه فریزر نگهداری شد. سپس هموزن به دست آمده به نسبت ۱:۱ با سمپل لودینگ بافر (۵۰mM تریس - کلرید هیدروژن، pH=۶/۸، ۲٪ سدیم دودسیل سولفات، ۱۰٪ گلیسرول، ۵٪ بتا-مرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵٪ برموفنول آبی) مخلوط گردید، سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. در ادامه از دستگاه مینی الکتروفورز عمودی ساخت BioRad, USA با منبع تامین انرژی استفاده شد. ابتدا ژل دناتوره کننده آکریل امید ۱۰٪ تهیه شد. از هر نمونه به اندازه ۱۰ میکرو لیتر (تقریباً ۵۰ میکرو گرم) در چاهک مربوطه قرار داده شد و سپس با برقراری جریان الکتریکی (ولتاژ ثابت) ۱۰۰ ولت و ۳۵

میلی آمپر پروتئین‌ها در ژل بالا حرکت کرده و به محض ورود به ژل پایین ولتاژ به ۲۰۰ افزایش داده شد. با رسیدن رنگ برم فنل بلو به انتهای ژل جریان قطع و ژل از قالب خارج شد. برای انجام کار الکتروترانسفر مراحل پایین به ترتیب انجام شد. ابتدا لایه‌های مرتب شده به ترتیب (از پایین به بالا: ۱- یک لایه ابر (اسکاج)، ۲- یک پد، ۳- ژل پلی آکریل آمید، ۴- غشا PVDF (قبل از استفاده با متانول به مدت ۵ دقیقه فعال گردید)، ۵- یک پد، ۶- یک لایه اسکاج) در میان صفحات شبکه قرار داده شدند. یک حاصله با یک نورد پلاستیکی حباب‌گیری شده و در داخل تانک الکتروترانسفر قرار گرفت. بعد از پر کردن تانک الکتروترانسفر با بافر مخصوص، صفحات شبکه غشا PVDF و ژل پلی آکریل آمید به صورتی در داخل آن قرار داده شد که غشا PVDF به صورت آند و ژل به صورت کاتد قرار گرفت. سپس جریان با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت و شدت جریان برقرار شد. به طور متوسط زمان ۲ ساعت برای ژل آکریل آمید با ضخامت ۱ میلی‌متر در نظر گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان فوق ضخامت پلی گلاس از تانک خارج گردید و غشا از ژل پلی آکریل آمید جدا شده سپس به منظور ثابت کردن پروتئین‌ها و رنگ‌آمیزی آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در داخل رنگ پانسو S قرار گرفتند. سپس غشا PVDF برای رنگ‌زدایی در داخل آب مقطر قرار داده شد و چندین بار آب مقطر تعویض گردید. برای اشیاع کردن جایگاه‌های اشغال نشده غشا PVDF به مدت ۲ ساعت داخل محلول BSA-PBS-T (۸۰ میلی‌لیتر PBS + ۲۰ میلی‌لیتر ۵٪ BSA + ۰/۱ میلی‌لیتر توین ۲۰) قرار داده شد. سپس غشا به مدت یک شب در محلول حاوی آنتی‌بادی کاسپاز ۳ (SANTA CRUZ, caspase-3 Antibody: sc-517380) رقیق شده در محلول BSA-PBS-T قرار گرفت. غشا از محلول فوق خارج شد و چهار بار به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS-T شستشو گردید. غشا PVDF از محلول فوق خارج شده و به صورت قبلی ولی این بار سه مرتبه هرکدام به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. بعد از خروج غشا از PBS به مدت سی ثانیه در داخل محلول سوبسترای آماده شده ECL طبق دستور العمل کیت (Bio-Rad, USA) قرار گرفت. بعد از پوشانده شدن با ورقه نازک نایلونی، فیلم رادیو گرافی در معرض نور لومینسانس ساطع شونده از غشا قرار داده شد. بعد از نورمالیزه کردن باندها با بتا اکتین (SANTA CRUZ,  $\beta$ -Actin (C4): sc-47778) برای کمی کردن دانسیته‌ها نمودار بار پلات (شکل ۱) ترسیم شد و چگالی باندها با استفاده از نسخه ۱/۶۲ بسته نرم‌افزاری دانسیتومتری (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA Image J) تعیین گردید.

### روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا از طبیعی بودن توزیع داده‌ها به کمک آزمون شاپیرو ویلک اطمینان حاصل شد و در ادامه برای مقایسه بین گروهی داده‌ها پس از پایان مداخله، از تحلیل واریانس تک راهه استفاده شد که در صورت معنی‌دار بودن نتایج، داده‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی و یا جیمز هاول (بسته به نتایج آزمون لون) مقایسه شدند. در تمام آزمون‌ها سطح اطمینان آماری برابر با ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در مورد هر سه متغیر تفاوت معنی‌دار بین گروهی (جدول ۱) مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در مقایسه‌های تعقیبی (جدول ۲) نیز مشاهده شد که مواجهه با آرسنیک از طریق آب آشامیدنی سبب افزایش مقدار کاسپاز ۳ و GRP78 و کاهش ظرفیت تام ضد اکسایشی هیپوکامپ شده است. به علاوه، تمرین هم باعث افزایش کاسپاز ۳ شد، ولی فقط کورکومین

سبب جبران تغییرات کاسپاز ۳ و ظرفیت تام ضد اکسایشی شد. تصاویر ایمنو هسیتوشیمی و وسترن بلات مربوط به گروهها در شکل های ۱ و ۲ ارائه شده است.

جدول ۱: میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای مورد اندازه گیری

نتایج تحلیل واریانس		نتایج آزمون (لون)		میانگین $\pm$ SD	تعداد	گروه	شاخص
sig	F	sig	F				
+ / + + ۱	۵۲/۸۹	+ / ۱۹	۱/۵۵	۳/۰۳ $\pm$ ۰/۲۷	۸	تمرین	کاسپاز ۳ / بنا آکتین
				۱/۶۸ $\pm$ ۰/۲۶	۸	کور کومین	
				۱/۴ $\pm$ ۰/۲۰	۸	کور کومین-تمرین	
				۳/۱۰ $\pm$ ۰/۲۹	۸	آرسنیک	
				۰/۹۲ $\pm$ ۰/۱۱	۸	اتانول-کنترل	
				۱/۰۰ $\pm$ ۰/۷۶	۸	کنترل آب مقطر	
+ / + + ۱	۵/۱۸	+ / ۱۳	۱/۷۷	۲۵/۰۸ $\pm$ ۲/۱۸	۸	تمرین	ظرفیت تام ضد اکسایشی هیپوکامپ (میکرومول $\times$ میلی گرم)
				۳۶/۶۰ $\pm$ ۱۲/۱۸	۸	کور کومین	
				۳۰/۵۸ $\pm$ ۴/۱۰	۸	کور کومین-تمرین	
				۲۴/۳۶ $\pm$ ۲/۸۸	۸	آرسنیک	
				۲۶/۷۵ $\pm$ ۲/۸۷	۸	اتانول-کنترل	
				۳۰/۷۲ $\pm$ ۲/۷۹	۸	کنترل آب مقطر	
+ / + + ۱	۷/۶۰	+ / ۰۲	۲/۸۸	۱/۴۱ $\pm$ ۰/۳۹	۸	تمرین	متوسط چگالی ایتیک GRP78
				۱/۳۳ $\pm$ ۰/۴۱	۸	کور کومین	
				۱/۲۸ $\pm$ ۰/۲۹	۸	کور کومین-تمرین	
				۱/۹۲ $\pm$ ۰/۴۱	۸	آرسنیک	
				۱/۱۳ $\pm$ ۰/۰۴	۸	اتانول-کنترل	
				۱/۰۰ $\pm$ ۰/۱۳	۸	کنترل آب مقطر	

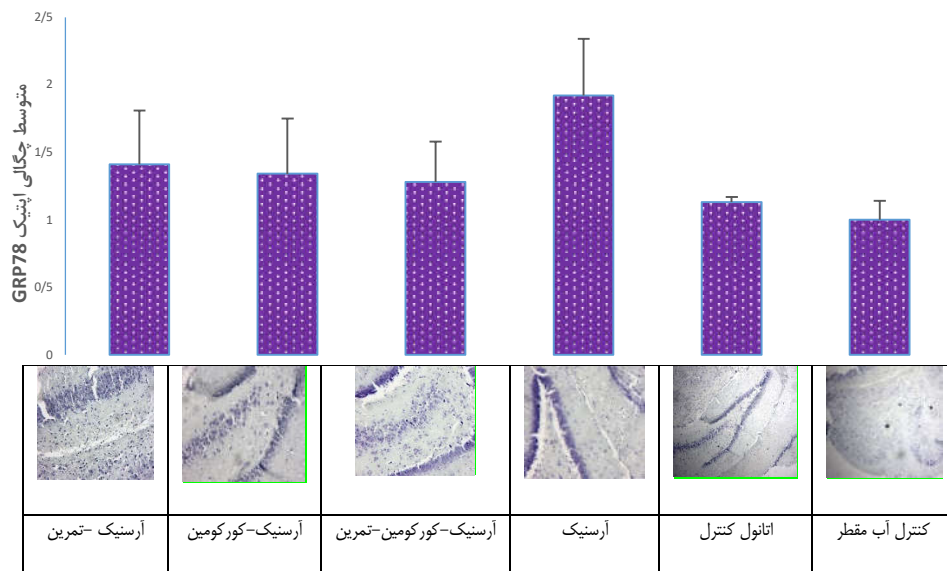
$P < 0/05$  بعنوان سطح معنادر در نظر گرفته شده است

جدول ۲: نتایج مقایسه بین گروهی متغیرهای پژوهش

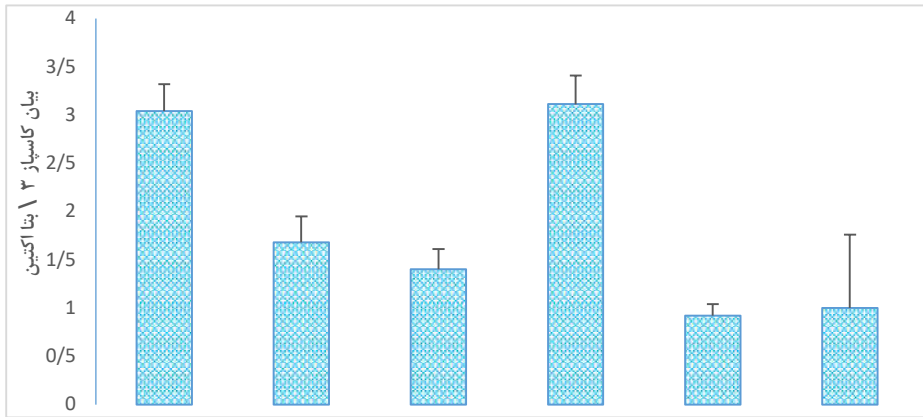
GRP78		TAC		کاسپاز ۳		مقایسه در بین گروهها
sig	اختلاف	sig	اختلاف	sig	اختلاف	
۰/۹۷	-۰/۱۳ $\pm$ ۰/۱۷	۰/۳۹	-۵/۴۹ $\pm$ ۲/۸۴	۰/۰۱	۱/۶۳ $\pm$ ۰/۱۹	تمرین با کور کومین-تمرین

GRP78		TAC		کاسپاز ۳		مقایسه در بین گروه‌ها
sig	اختلاف	sig	اختلاف	sig	اختلاف	
۰/۱۹	-۰/۵۰ ± ۰/۲۰	۰/۹	۰/۷۲ ± ۲/۸۴	۰/۹	-۰/۰۷ ± ۰/۱۹	تمرین با آرسنیک
۰/۴۳	۰/۲۷ ± ۰/۱۴	۰/۹	-۱/۶۶ ± ۲/۸۴	۰/۰۰۱	۲/۱۱ ± ۰/۱۹	تمرین با اتانول-کنترل
۰/۱۵	۰/۴۱ ± ۰/۱۴	۰/۳۷	-۵/۸۳ ± ۲/۸۴	۰/۰۰۱	۲/۰۳ ± ۰/۱۹	تمرین با کنترل آب مقطر
۰/۹	-۰/۵۵ ± ۰/۱۷	۰/۳۰	۶/۰۱ ± ۲/۸۴	۰/۶۸	۰/۲۸ ± ۰/۱۹	کورکومین با کورکومین-تمرین
۰/۱۱	-۰/۵۸ ± ۰/۲۰	۰/۰۰۱	۱۲/۲۳ ± ۲/۸۴	۰/۰۰۱	-۱/۴۲ ± ۰/۱۹	کورکومین با آرسنیک
۰/۷۳	۰/۲۰ ± ۰/۱۴	۰/۰۱۵	۸۴/۹ ± ۲/۸۴	۰/۰۰۳	۰/۷۵ ± ۰/۱۹	کورکومین با اتانول-کنترل
۰/۳۲	۰/۳۳ ± ۰/۱۵	۰/۳۲	۵/۸۷ ± ۲/۸۴	۰/۰۱۱	۰/۶۸ ± ۰/۱۹	کورکومین با کنترل آب مقطر
۰/۷۲	۰/۱۴ ± ۰/۱۰	۰/۷۵	۳/۸۳ ± ۲/۸۴	۰/۱۴	۰/۴۷ ± ۰/۱۹	کورکومین-تمرین با اتانول-کنترل
۰/۲۳	۰/۲۸ ± ۰/۱۱	۰/۹۹	-۰/۱۳ ± ۲/۸۴	۰/۳۰	۰/۴ ± ۰/۱۹	کورکومین-تمرین با کنترل آب مقطر
۰/۰۰۸	۰/۷۸ ± ۰/۱۴	۰/۲۴	-۲/۳۹ ± ۲/۸۴	۰/۰۰۱	۲/۱۸ ± ۰/۱۹	آرسنیک با اتانول-کنترل
۰/۰۰۲	۰/۹۲ ± ۰/۱۵	۰/۹۵	-۶/۳۶ ± ۲/۸۴	۰/۰۰۱	۲/۱۰ ± ۰/۱۹	آرسنیک با کنترل آب مقطر
۰/۲۰	۰/۱۳ ± ۰/۰۵	۰/۷۳	-۳/۹۵ ± ۲/۸۴	۰/۹	-۰/۰۷ ± ۰/۱۹	اتانول-کنترل با کنترل آب مقطر

$P < 0.05$  بعنوان سطح معنادار در نظر گرفته شده است  
 داده‌ها بر حسب  $(\bar{x} \pm Se)$  می‌باشد.



شکل ۱: متوسط چگالی اپتیک GRP78 در هیپوکامپ گروه‌ها



Caspase 3



B Actin



گروه                      تمرین                      کور کومین                      کور کومین-تمرین                      آرسنیک                      اتانول                      کنترل آب مقطر

شکل ۲: مقدار کاسپاز ۳ در هیپوکامپ گروه‌ها

### بحث و بررسی

در اولین بخش یافته‌ها، مواجهه با آرسنیک باعث افزایش بیان پروتئین کاسپاز ۳ در هیپوکامپ شد و فقط مکمل کورکومین قادر به کمتر کردن مقدار این افزایش بود. این افزایش مقدار کاسپاز ۳ در بافت مغز می‌تواند دلیل نسبتاً محکمی برای بروز آپوپتوز غیرقابل برگشت سلول‌های عصبی باشد که به تحلیل عصبی منجر خواهد شد (۱۴). اگرچه که ما بافت مخلوط هیپوکامپ را مطالعه کردیم و سهم دقیق سلول‌های عصبی (نرون‌ها) و غیر عصبی (نروگلیاها) از این مقدار افزایش مشاهده شده در محتوای کاسپاز ۳ بافت مغز (که آنها را در معرض تحلیل قرار می‌دهد)، معلوم نیست. تحقیقات بسیار زیادی تاثیر مواجهه با آرسنیک را بر تحلیل عصبی و افت ظرفیت شناختی تایید کرده‌اند (۱۷) و چندین مکانیسم مربوط به سمیت آرسنیک با مکانیسم‌های مرتبط با تحلیل عصبی همخوان هستند که شامل استرس اکسایشی، التهاب، نقص در تجزیه پروتئین، نقص در اتوفازژی و تجمع پروتئینها در درون سلول، استرس شبکه اندوپلاسمی و نارسایی عملکردی میتوکندری می‌باشند (۱۸).

البته ما بروز مرگ آپوپتوزی را به طور مستقیم در نرون‌ها بررسی نکردیم و فقط افزایش محتوای کاسپاز ۳ فعال شده را به عنوان دلیل غیرقابل برگشت آپوپتوز لحاظ کردیم (۱۹). با این حال، افزایش کاسپاز ۳ سلول‌های عصبی در همه موارد دلیل مستقیم بر رخداد واقعی آپوپتوز نیست و حتی می‌تواند به عنوان یک مولکول تنظیمی در نروژنز و فعالیت سیناپسی عمل کند (۲۰). ولی سمیت آرسنیک به واسطه هر دو مسیر آپوپتوز و نکروز اتفاق می‌افتد که به دوز و



مدت مواجهه بستگی دارد. مرگ آپوپتوزی بیشتر در مواجهه طولانی مدت (بیش از ۴۰ ساعت) اتفاق می‌افتد که با فعال‌سازی مسیر p53 و آزاد شدن سایر پروتئینهای میتوکندری به سیتوزول در حین این مدت مرتبط است. ولی مرگ سلولی نکروزه‌ای خیلی زود هنگام (در حدود ۱۰ ساعت) اتفاق می‌افتد و حداکثر تا حدود ۴۰ ساعت ادامه دارد که به آسیب پتانسیل غشایی میتوکندری و تولید گونه‌های فعال اکسیژن مربوط است (۲۱). به علاوه، درگیری مسیر اتوفازی هم در مرگ سلولی عصبی ناشی از آرسنیک تایید شده است (۲۲). بدین ترتیب به نظر می‌رسد که در بررسی نقش کورکومین و تمرین هوازی در مواجهه با آرسنیک، مطالعه مرگ آپوپتوزی اولویت بیشتری دارد، چرا که معمولا مواجهه انسان در مدت زمان خیلی طولانی‌تر اتفاق می‌افتد و معمولا دوز آنقدر بالا نیست که سریع کشنده باشد. اما در این تحقیق در مورد تفکیک مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز و اتوفازی و استرس شبکه ER و همچنین تمایز آن از سایر انواع مرگ سلولی از قبیل نکروز، هیچ متغیری اندازه‌گیری نشد که از محدودیت‌های دیگر آن محسوب می‌شود. به علاوه، مواجهه با آرسنیک موجب التهاب سیستمیک می‌شود (۲۳). همچنین آسیب میتوکندریایی سلول‌های عصبی و آسیب DNA ناشی از مواجهه با آرسنیک نیز بدیهی است که احتمال پیام‌رسانی مرگ سلولی از هر دو مسیر داخلی و بیرونی را تایید می‌کند.

با این حال، شاید هم در جریان مرگ سلولی ناشی از آرسنیک، بین فعال‌سازی از مسیر درونی و بیرونی برهمکنش وجود داشته باشد، طوری که فعال شدن یک مسیر، سبب آغاز فعال‌سازی دیگری شود. اما پیشنهاد شده است که منشاء فعال‌سازی نهایی کاسپاز ۳ سلول‌های مغزی به دنبال مواجهه با آرسنیک از هر مسیری هم که باشد، احتمالا از استرس اکسایشی منشاء می‌گیرند (۲۴). اما در حالی که کورکومین قابلیت‌های زیادی دارد، مقدار پایین جذب روده ای، بی‌ثباتی ساختاری، نفوذ محدود به سد خونی مغزی و تجزیه سریع آن در بدن سبب محدود شدن قابلیت آن به عنوان یک عامل درمانی در کارآزمایی‌های بالینی شده است (۲۵). به علاوه، ماهیت آبگریز کورکومین سبب کاهش حل‌پذیری آن در محلول‌های آبی می‌شود که فراهمی زیستی آن را به چالش می‌کشد. بنابراین اثرات مثبت مشاهده شده در حیوانات ممکن است که مستقیما به انسان قابل تعمیم نباشد (۲۶).

در بخش دیگر یافته‌ها مشاهده شد که مواجهه با آرسنیک سبب افزایش استرس اکسایشی بافت مغز (اندازه‌گیری شده از طریق کاهش TAC) می‌شود و فقط مصرف مکمل کورکومین از این افزایش جلوگیری می‌کند. ذخایر GSH در حین متابولیسم آرسنیک و همچنین در پاسخ به گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از آرسنیک مصرف می‌شوند. به علاوه، کاهش دسترسی به GSH ناشی از سمیت آرسنیک سبب تجمع بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش فعالیت آنزیمی غشایی میتوکندری منجر می‌شود (۸). اما اثرات محافظت کننده عصبی کورکومین در نروتوکسیستی ناشی از آرسنیک تقریبا امری تایید شده است (۲۷) و کورکومین در سلول‌های عصبی از طریق مسیر NRF2<sup>1</sup> و APE1<sup>2</sup> (۲۸) سبب محافظت در برابر بروز آپوپتوز می‌شود. ولی هنوز برای تایید کارایی کورکومین در انسانها نیاز به تحقیقات بیشتر باقی است (۱۲). در یک تحقیق تاثیر هشت هفته دریافت کورکومین و تمرین هوازی به دنبال دریافت اسات سرب منجر به کاهش MDA هیپوکامپ و پلازما و افزایش ذخایر تام آنتی اکسیدانی پلازما شدند (۲۹) که به نوعی با نتایج تحقیق حاضر در توافق است. با این حال، مجددا باید یادآوری شود که جذب کورکومین و مقدار پایداری آن در بدن هنوز با سوال مواجه است و ما از سرنوشت جذب و عبور از لوله گوارشی اطمینان حاصل نکردیم که از محدودیت‌های تحقیق حاضر است.

<sup>1</sup> Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2

<sup>2</sup> Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1

با اینکه قابلیت تمرین در بهبود ظرفیت ضد اکسایشی امری محرز است، اما کمتر بودن قابلیت تمرین در تسکین وضعیت اکسایشی موشهای تحت مواجهه با آرسنیک نسبت به مکمل کورکومین شاید تا اندازه‌ای منطقی باشد. به طوری که احتمالاً مواجهه با آرسنیک سبب تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن شده و بنابراین در این شرایط، تمرین تاحدی به صورت یک عامل استرس آفرین اضافی عمل کرده است. اما در صورتی که در روش تحقیق ما، گروه تمرین بدون مواجهه با آرسنیک در نظر گرفته می‌شد، این استنباط قوت بیشتری داشت. البته تاکنون بررسی سازگارپذیری بدن با تمرین ورزشی در شرایط مواجهه با آرسنیک گزارش نشده است و در کل فقط یک تحقیق در مورد تمرین بر روی نمونه‌های تحت مواجهه با آرسنیک موجود است که بر تاثیر تمرین بر هیپوکامپ و حافظه در شرایط مواجهه با آرسنیک متمرکز شده است (۳۰). به هر حال در حین انجام تمرین در شرایط مواجهه با آرسنیک، تضعیف قابلیت کلی سیستم ضد اکسایشی بدن و مغز مورد انتظار است و در این شرایط احتمالاً تمرین نمی‌تواند در مقایسه با کورکومین سودمندی یکسانی را نشان دهد. البته شاخص  $ORAC^1$  کورکومین نسبتاً بالا است و بدیهی است که در بهبود وضعیت ضد اکسایشی قابلیت بیشتری داشته باشد، چرا مقدار قابل توجهی از مواد فیتوشیمیایی دارای قابلیت ضد اکسایشی را در اختیار بدن قرار می‌دهد، اما تمرین بیشتر از مسیر آنزیمی سیستم ضد اکسایشی را تقویت می‌کند (۳۱).

در بخش دیگر یافته‌ها مشاهده شد که نه تمرین، نه کورکومین و نه مصرف توام کورکومین همراه با تمرین نتوانستند از افزایش مقدار بیان GRP78 یا BIP به عنوان شاخص معتبر برای فعال‌سازی استرس شبکه ER در مغز جلوگیری کنند. در یک تحقیق نیز گزارش شده است با اینکه مواجهه نرونها با آرسنیک به صورت حاد و در شرایط *in vitro* سبب برهم خوردن توازن بین مسیرهای پیش آپوپتوزی و مسیرهای فعال کننده بقای سلولی می‌شود، ولی با وجود افزایش فعال‌سازی GRP78، استرس شبکه اندوپلاسمی بروز نمی‌کند که پیشنهاد می‌کند مواجهه با آرسنیک سبب مرگ آپوپتوزی از مسیر استرس ER نخواهد شد (۳۲). در یک تحقیق دیگر هم آرسنیک سبب بروز آپوپتوز عصبی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن از طریق مسیر JNK/ERK وابسته به مسیر میتوکندری (مسیر داخلی) و همچنین از طریق مسیر تنظیم شده از طریق GRP 78/CHOP (مسیر استرس شبکه ER) شد (۳۳) که مصرف آنتی‌اکسیدان سبب جلوگیری از بروز این پاسخ شد و با نتایج تحقیق حاضر توافق دارد. سایر تحقیقات هم نقش GRP78 در آپوپتوز سلول‌های مغزی را گزارش کرده‌اند (۲۴) و در کل بر آپوپتوز تنظیم شونده با فعال‌سازی GRP 78 در مواجهه با آرسنیک دلالت می‌کنند. البته بروز آپوپتوز از مسیر استرس شبکه ER به طور مستقل از مسیر میتوکندری از طریق فعال‌سازی کاسپاز ۱۲ در فرادست کاسپاز ۹، می‌تواند در نهایت به فعال شدن کاسپاز ۳ منجر شود (۳۴).

اما نکته اصلی حاصل از این یافته شاید آن باشد که مواجهه با آرسنیک مغز را در معرض استرس ER (استنباط شده از روی افزایش مقدار GRP78) قرار می‌دهد که فقط تمرین و یا فقط مصرف کورکومین برای تسکین آن کافی نیست و این امر علاوه بر افزایش احتمال مرگ سلولی مغزی که می‌تواند زمینه ساز بیماری‌های تحلیل عصبی شود، همچنین فرد را احتمالاً مستعد بروز نارسایی‌های عصبی و روانی (به دلیل درگیری GRP78 در علت شناسی بیماری‌های روانی (۳۵)) خواهد ساخت. بنابراین قطعاً برای جمعیت در حال ورزش ساکن در مناطق تحت مواجهه با آرسنیک از آب آشامیدنی، اتخاذ روش‌های مناسب برای جبران استرس شبکه ER در مغز و شاید سایر بخش‌های دیگر بدن ضروری است.

<sup>1</sup> Oxygen Radical Absorbance Capacity

به هر حال، افزایش مرگ نرونی ناشی از مواجهه با آرسنیک در انسانها می‌تواند به تحلیل عصبی و تضعیف حافظه منجر شود. از سوئی ورزش اثر حفاظتی بر مغز و یادگیری دارد و در جلوگیری از تضعیف حافظه ناشی از مواجهه با آرسنیک موثر است (۳۶). بالینحال، اطلاعات بسیار اندکی در این زمینه موجود می‌باشد و تاکنون فقط در یک تحقیق تاثیر ورزش بر آثار سمی آرسنیک در مغز مطالعه شده است که نشان دادند با اینکه مواجهه با آرسنیک سبب تضعیف حافظه بازشناسی اشیاء در درازمدت می‌شود، ولی عملکرد شناختی تا اندازه‌ای در برابر سمیت آرسنیک مقاومت دارد (۳۶). البته ما هیچ جنبه فنوتیپی از ساختار و عملکرد مغز را بررسی نکردیم. اما گزارش شده است که تاثیر آرسنیک بر عملکرد حرکتی هم به دوز آن وابسته است (۳۷). لازم به ذکر است که موشهای مورد بررسی در این تحقیق روزانه دوز ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حل شده در ۲ میلی لیتر آب مقطر در روز را مصرف کردند که با در نظر گرفتن دوز مجاز موجود در آب آشامیدنی انسانی (۱۰ میکروگرم بر لیتر) و مصرف دو لیتر آب برای هر فرد معمولی، به نظر می‌رسد که این دوز نسبت به حد مجاز در آب آشامیدنی انسانی، بالا بود. اگرچه که در تحقیقات گذشته در مورد بررسی اثرات سمی آرسنیک از طریق آب آشامیدنی، تنوعی از دوزهای آرسنیک در دامنه ۱ تا ۲۰ میلی گرم در هر کیلو وزن بدن در روز هم مطالعه شده اند (۳۸) که اکثرا دوز آنها بالاتر از دوز بررسی در این تحقیق بوده است.

همچنین برخی از افراد حساسیت بیشتری به بیماری‌های مرتبط با آرسنیک دارند. این مساله می‌تواند به ژنوم فرد میزبان مربوط باشد که می‌تواند بر مقدار انتقال، تغییر شکل زیستی، پاسخ استرس اکسایشی و ترمیم DNA در برابر سمیت آرسنیک تاثیر گذار باشد. به علاوه، سبک زندگی و عوامل غذایی مانند فولات، ویتامین C و میوه جات و ترکیب میکروبیای روده هم در این زمینه دخالت دارند (۳۹). بدین ترتیب با اینکه این تحقیق بر روی موشهای دارای ژنتیک مشابه و در شرایط آزمایشگاهی انجام شد، اما امکان تعمیم نتایج آن به شرایط واقعی افراد تحت مواجهه با آرسنیک (در حال تمرین همراه با مصرف مکمل کورکومین و در ضمن دارای ژنتیک و عادات غذایی متفاوت) را کمتر می‌کند. اما مهم ترین محدودیت این بود که هیچ متغیری در مورد پیامدهای عینی ناشی از اثرات سمی احتمالی مواجهه با آرسنیک و اثرگذاری احتمالی تمرین و مصرف مکمل کورکومین بر ساختار و عملکرد مغز و عملکرد عصبی و روانی و حرکتی بررسی نشد. همچنین تعداد اندک آزمودنی‌ها، عدم کسب اطمینان از بروز واقعی مرگ نرونی و سرنوشت و مقدار جذب کورکومین، عدم اندازه‌گیری شاخص‌های منعکس کننده وضعیت آمادگی جسمانی و مقدار مسافت طی شده و سایر شاخص‌های بیوشیمیایی مربوط به پایش اثرات حاصل از تمرینات بدنی، در نظر نگرفتن گروه تمرین بدون مواجهه با آرسنیک، تفکیک مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز و اتوفاژی و استرس شبکه ER و همچنین تمایز آن از سایر انواع مرگ سلولی از قبیل نکروز از سایر محدودیتهای آن بودند که برای شفاف‌سازی بیشتر باید در تحقیقات آینده در نظر گرفته شوند.

### نتیجه‌گیری

در کل نتیجه‌گیری شد که مواجهه با آرسنیک می‌تواند به بروز استرس اکسایشی، و فعال شدن مسیرهای آپوپتوز (استنباط از روی افزایش کاسپاز ۳) و استرس شبکه ER (استنباط شده از روی افزایش مقدار GRP78) در هیپوکامپ مغز منجر شود. اما تمرین ورزشی و به ویژه مکمل کورکومین اگرچه که در این بین به درجاتی دارای اثرات محافظتی هستند، اما شاید در افراد در حال ورزش ساکن در مناطق تحت مواجهه با آرسنیک، فقط اتکا به قابلیت‌های مورد انتظار از سازگاری‌های حاصل از تمرین و فواید محافظتی کورکومین کافی نباشد. شاید نیاز به سایر مداخلاتی از

جمله مصرف فولات و ... نیز وجود داشته باشد. اما به دلیل محدودیتهای موجود در این تحقیق و کمبود شواهد مستقیم در جمعیت انسانی در حال ورزش تحت مواجهه مزمن با آرسنیک، هنوز نیاز به بررسی‌های بیشتر باقی است.

#### منابع

1. Sun H, Yang Y, Shao H, Sun W, Gu M, Wang H, et al. Sodium Arsenite-Induced Learning and Memory Impairment Is Associated with Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Rat Hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017;10:286.
2. Gao B, Zhang X-y, Han R, Zhang T-t, Chen C, Qin Z-h, et al. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013;34(5):657-66.
3. Svensson M, Lexell J, Deierborg T. Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, and Behavior: What We Can Learn From Animal Models in Clinical Settings. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2014;29(6):577-89.
4. Inoue K, Hanaoka Y, Nishijima T, Okamoto M, Chang H, Saito T, et al. Long-term mild exercise training enhances hippocampus-dependent memory in rats. *International journal of sports medicine*. 2015;36(04):280-5.
5. Wagner G, Herbsleb M, de la Cruz F, Schumann A, Brünner F, Schachtzabel C, et al. Hippocampal structure, metabolism, and inflammatory response after a 6-week intense aerobic exercise in healthy young adults: a controlled trial. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2015;35(10):1570-8.
6. Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB, et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiology & behavior*. 2018;184:6-11.
7. Kang E-B, Kwon I-S, Koo J-H, Kim E-J, Kim C-H, Lee J, et al. Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during A $\beta$ -induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. *Apoptosis*. 2013;18(11):1332-47.
8. Binu P, Priya N, Abhilash S, Vineetha RC, Nair RH. Studies on curative efficacy of monoterpene eugenol on anti-leukemic drug arsenic trioxide induced cardiotoxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy*. *Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;91:559-66.
9. Freitas RM, Vasconcelos SMM, Souza FCF, Viana GSB, Fonteles MMF. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *The FEBS Journal*. 2005;272(6):1307-12.
10. Abrahams S, Haylett WL, Johnson G, Carr JA, Bardien S. Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. *Neuroscience*. 2019;406:1-21.
11. Yadav RS, Shukla RK, Sankhwar ML, Patel DK, Ansari RW, Pant AB, et al. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats. *NeuroToxicology*. 2010;31(5):533-9.
12. Farkhondeh T, Samarghandian S, Samini F. Antidotal effects of curcumin against neurotoxic agents: An updated review. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2016;9(10):947-53.

13. Hosseinzadeh S, Roshan VD, Mahjoub S. Continuous exercise training and curcumin attenuate changes in brain-derived neurotrophic factor and oxidative stress induced by lead acetate in the hippocampus of male rats. *Pharmaceutical biology*. 2013;51(2):240-5.
14. Mai Z, Liu H. Boolean network-based analysis of the apoptosis network: Irreversible apoptosis and stable surviving. *Journal of Theoretical Biology*. 2009;259(4):760-9.
15. Hemmati AA, Olapour S, Varzi HN, Khodayar MJ, Dianat M, Mohammadian B, et al. Ellagic acid protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in rat. *Human & Experimental Toxicology*. 2017;37(4):412-9.
16. Biswas J, Roy S, Mukherjee S, Sinha D, Roy MJAPjocpA. Indian spice curcumin may be an effective strategy to combat the genotoxicity of arsenic in Swiss albino mice. 2010;11(1):239.
17. Escudero-Lourdes C. Toxicity mechanisms of arsenic that are shared with neurodegenerative diseases and cognitive impairment: role of oxidative stress and inflammatory responses. *Neurotoxicology*. 2016;53:223-35.
18. Wolfe MS. Preface. *The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases*: Elsevier; 2018. p. xiii-xiv.
19. Porter AG, Jänicke RUJcd, differentiation. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. 1999;6(2):99-104.
20. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2010;17(7):1104-14.
21. Selvaraj V, Armistead MY, Cohenford M, Murray E. Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line. *Chemosphere*. 2013;90(3):1201-9.
22. Manthari RK, Tikka C, Ommati MM, Niu R, Sun Z, Wang J, et al. Arsenic induces autophagy in developmental mouse cerebral cortex and hippocampus by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: involvement of blood-brain barrier's tight junction proteins. 2018;92(11):3255-75.
23. Prasad P, Sinha DJES, Research P. Low-level arsenic causes chronic inflammation and suppresses expression of phagocytic receptors. 2017;24(12):11708-21.
24. Yen CC, Ho TJ, Wu CC, Chang CF, Su CC, Chen YW, et al. Inorganic arsenic causes cell apoptosis in mouse cerebrum through an oxidative stress-regulated signaling pathway. 2011;85(6):565-75.
25. Ullah F, Liang A, Rangel A, Gyengesi E, Niedermayer G, Münch G. High bioavailability curcumin: an anti-inflammatory and neurosupportive bioactive nutrient for neurodegenerative diseases characterized by chronic neuroinflammation. *Archives of Toxicology*. 2017;91(4):1623-34.
26. Squillaro T, Cimini A, Peluso G, Giordano A, Melone MAB. Nano-delivery systems for encapsulation of dietary polyphenols: An experimental approach for neurodegenerative diseases and brain tumors. *Biochemical Pharmacology*. 2018;154:303-17.
27. Yadav RS, Shukla RK, Sankhwar ML, Patel DK, Ansari RW, Pant AB, et al. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats. 2010;31(5):533-9.
28. Sarkar B, Dhiman M, Mittal S, Mantha AK. Curcumin revitalizes Amyloid beta (25–35)-induced and organophosphate pesticides pestered neurotoxicity in SH-SY5Y and IMR-32 cells via activation of APE1 and Nrf2. *Metabolic Brain Disease*. 2017;32(6):2045-61.

29. Hosseinzadeh S, Roshan VD, Mahjoub S. Continuous exercise training and curcumin attenuate changes in brain-derived neurotrophic factor and oxidative stress induced by lead acetate in the hippocampus of male rats. *Pharmaceutical Biology*. 2012;51(2):240-5.
30. Sun B-F, Wang Q-Q, Yu Z-J, Yu Y, Xiao C-L, Kang C-S, et al. Exercise prevents memory impairment induced by arsenic exposure in mice: implication of hippocampal BDNF and CREB. 2015;10(9).
31. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh CJM, Sports Si, Exercise. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. 1999;31(7):987-97.
32. Mengesdorf T, Althausen S, Paschen WJMbr. Genes associated with pro-apoptotic and protective mechanisms are affected differently on exposure of neuronal cell cultures to arsenite. No indication for endoplasmic reticulum stress despite activation of grp78 and gadd153 expression. 2002;104(2):227-39.
33. Lu T-H, Tseng T-J, Su C-C, Tang F-C, Yen C-C, Liu Y-Y, et al. Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP 78/CHOP-regulated pathways. 2014;224(1):130-40.
34. Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K, Tohyama MJNl. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. 2004;357(2):127-30.
35. Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J, Hohjoh HJMp. Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. 2007;12(6):593-600.
36. Sun B-F, Wang Q-Q, Yu Z-J, Yu Y, Xiao C-L, Kang C-S, et al. Exercise Prevents Memory Impairment Induced by Arsenic Exposure in Mice: Implication of Hippocampal BDNF and CREB. *PLoS ONE*. 2015;10(9).
37. Bardullas U, Limón-Pacheco J, Giordano M, Carrizales L, Mendoza-Trejo M, Rodríguez VJT, et al. Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009;239(2):169-77.
38. Srivastava P, Yadav RS, Chandravanshi LP, Shukla RK, Dhuriya YK, Chauhan LKS, et al. Unraveling the mechanism of neuroprotection of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;279(3):428-40.
39. Chi L, Gao B, Tu P, Liu C-W, Xue J, Lai Y, et al. Individual susceptibility to arsenic-induced diseases: the role of host genetics, nutritional status, and the gut microbiome. *Mammalian genome* 2018;29(1-2):63-79.

## **Effects of High Intensity Interval Training and Curcumin Supplementation on Hippocampal Total Antioxidant Capacity, GRP78 and Caspase 3 Level in Male Rats Exposed to Arsenic**

Abdollah Hosseinlou<sup>1</sup>, Roghayeh-Pouzesht Jadidi<sup>1</sup>, Jabbar Bashiri<sup>1</sup>, Mir Ali Reza Nourazar<sup>2</sup>, Karim Azali-Alamdari<sup>3\*</sup>.

1 Department of Exercise Physiology, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2 Department of Veterinary, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3 Department of Exercise Physiology, Faculty of Education and Psychology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

\* **Corresponding author:** Email: k.azali@azaruniv.ac.ir

### **Abstract**

**Background and Purpose:** There is a little information about the synergic effects of exercise training and curcumin supplementations on arsenic exposure in the brain. We investigated the effects of six weeks of aerobic training and curcumin supplementation on hippocampal caspase 3, total antioxidant capacity and GRP78 level in rats exposed to arsenic.

**Methodology:** Eighty five male rats were randomized in six groups including training, curcumin, training+curcumin, arsenic, ethanol control and normal control. Arsenic and curcumin were administered orally for entire the study period. HIIT were conducted for six weeks (5 d/w, 60 min/session (with 4 min running at 85-90% of Vo<sub>2</sub>max and 2 min recovery at 50-60% of Vo<sub>2</sub>max intervals).

**Results:** Exposure to arsenic through drinking water caused a significant increase in the amount of caspase 3 (P=0.001) and GRP78 (P=0.001) and a non-significant decrease in the total antioxidant capacity level (P=0.95) of the hippocampus. HIIT also significantly elevated hippocampal caspase 3 level (P=0.001), however only curcumin supplementation could attenuate caspase 3 (P=0.001) and TAC alterations (P=0.001) induced by arsenic exposure.

**Conclusion:** Arsenic exposure renders the hippocampus to oxidative stress and risk of apoptosis. In spite of a remarkable protective effects by curcumin supplementation, HIIT fails to overcome arsenic toxicity in the brain.

**Key words:** Arsenic, Hippocampus, HIIT, Curcumin, Cell Death