



Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

Volume 21, Issue 3 (Summer 2019), 395- 578

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:

Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

اثر درمانی مصرف مکمل رزوراترول با ورزش تناوبی و تداومی بر میزان آپوتوز و پروفایل لیپیدی بافت کبد موش‌های مبتلا به کبد چرب غیر الکلی

امیر حاجی قاسمی^۱ (Ph.D Student)، پروین فرزانیگی^{۱*} (Ph.D)، زهره مظاهری^۲ (Ph.D)

۱- گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ایران

۲- گروه علوم آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۵

Parvin.farzanegi@gmail.com

تلفن: ۰۹۱۱۲۲۳۰۲۲۳

چکیده

هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) یکی از شایع‌ترین اختلالات مزمن کبدی می‌باشد. در این مطالعه، تاثیر درمانی مکمل رزوراترول به تنهایی و یا همراه با تمرین‌های ورزشی تداومی و تناوبی بر روی میزان آپوتوز بافت کبد و پروفایل لیپیدی سرم موش‌های مسن مبتلا به NAFLD مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: موش‌های مسن به دو گروه اصلی بیمار NAFLD و کنترل تقسیم شدند. موش‌های گروه بیمار NAFLD مجدداً به ۷ زیر گروه تجربی شامل بیمار، دریافت کننده‌های سالین، رزوراترول (RSV)، ورزش تناوبی، ورزش تداومی، رزوراترول + ورزش تناوبی، و رزوراترول + ورزش تداومی تقسیم شدند. بیومارکرهای آپوتوز شامل پروتئین‌های Bax و Bcl2 در بافت کبدی و هم‌چنین پروفایل لیپیدی سرم شامل HDL، LDL، کلسترول تام (Cho) و تری گلیسرید (TG) به روش ELISA اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: تجویز رزوراترول به تنهایی و یا در ترکیب با تمرین‌های ورزشی سبب کاهش معنی‌داری در سطح سرمی LDL، Cho و TG و افزایش معنی‌داری در سطح HDL شد ($p < 0.05$). هم‌چنین رزوراترول به تنهایی و یا در ترکیب با تمرین‌های ورزشی تناوبی یا تداومی سبب کاهش معنی‌داری در غلظت پروتئین Bax و افزایش معنی‌داری در سطح Bcl2 شد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: بیماری NAFLD به طور معنی‌داری با افزایش آپوتوز سلول‌های کبدی و اختلال پروفایل لیپیدی همراه می‌باشد. اگر چه تجویز رزوراترول به تنهایی دارای خواص ضدآپوتوزی و کاهش چربی می‌باشد، درمان ترکیبی آن با تمرین ورزشی می‌تواند موثرتر واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: آپوتوزیس، استرس اکسیداتیو، بیماری کبد چرب غیرالکلی، لیپیدها، ورزش، رزوراترول

راهکارهای درمانی برای افراد مبتلا به کبد چرب غیرالکلی بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

یکی از اولین پیامدهای اختلال کبدی در بیماری NAFLD تغییر در پروفایل لیپیدی سرمی و هم‌چنین افزایش آنزیم‌های اختصاصی کبدی در پی آسیب‌های کبدی می‌باشد. مطالعات متعددی نشان دادند که NAFLD با افزایش برخی از لیپیدهای سرمی از جمله تری‌گلیسرید (TG)، لیوپروتئین با دانسیته پائین (LDL)، کلسترول تام (Cho) و از طرفی کاهش لیوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) همراه می‌باشد [۲، ۳]. افزایش تجمع چربی در سلول‌های بافت کبدی به صورت

مقدمه

کبد چرب غیرالکلی (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) یکی از شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی می‌باشد که با افزایش سن شیوع آن بیش‌تر می‌شود. این بیماری شامل طیف وسیعی از اختلالات است که با رسوب چربی در هیپاتوسیت‌ها ارتباط دارد و از استئاتوز تا NASH و فیروز یا سیروز کبدی را در بر می‌گیرد [۱]. با توجه به نقش بسیار محوری بافت کبد در بدن و این‌که کبد چرب ممکن است که با آسیب شدید عملکرد کبدی همراه باشد، لذا پیشگیری و پیدا کردن

می‌تواند احتمالاً با کاهش آپوتوز و بهبود پروفایل لیپیدی به عنوان یکی از روش‌های درمانی احتمالی مورد مطالعه بیش‌تری قرار گیرد.

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و هم‌چنین انجام منظم فعالیت‌های فیزیکی یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی هستند که امروزه نظر محققین زیادی را در جهت کنترل و درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی به خود جلب نموده‌اند [۱۱،۱۰]. برای مثال، اخیراً در یک مطالعه‌ای حاجی قاسم و همکاران نشان دادند که تمرین ورزشی تناوبی و تداومی با افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و هم‌چنین سطح مدیاتور ضد التهابی IL-10 در بافت کبدی همراه بوده است، در حالی‌که سطح مدیاتور التهابی TNF-a، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و هم‌چنین تعداد سلول‌های آپوتوز کبدی به طور معنی‌داری کاهش یافته بود [۵].

رزوراترول (۳ و ۵ و ۴- تری هیدروکسی استیلین) یک ترکیب گیاهی متعلق به گروه پلی‌فنل‌ها می‌باشد که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی فواید و خواص زیادی دارد [۱۲]. این مکمل نه تنها روند پیری را کند و طول عمر را افزایش می‌دهد، بلکه هم‌چنین با تنظیم مسیرهای متابولیمی سطح انسولین را برای سلامتی نرمال کنترل نموده و موجب طول عمر سلول‌ها می‌شود [۱۳]. مطالعات اخیر نشان دادند که رزوراترول فشار خون را کنترل و مانع از افزایش چربی خون می‌شود [۱۴]. مطالعات زیادی هم‌چنین گزارش کردند که رزوراترول از طریق خواص آنتی‌اکسیدانتی بالای خود سبب محافظت سلول‌های کبدی می‌گردد [۱۵].

از آن‌جایی که آپوتوز سلولی به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی محسوب می‌شوند، به نظر می‌رسد که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها توام با فعالیت ورزشی منظم با بهبود این فاکتور کمک زیادی در کاهش میزان آپوتوز سلولی داشته باشد [۱۶]. با توجه به خواص بالای آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی رزوراترول، مصرف این ترکیب توام با فعالیت‌های ورزشی در جهت کاهش آپوتوز سلول‌های بافت کبدی در بیماران مبتلا به NAFLD انجام نشده است. بنابراین، با توجه به اثرات مفید فعالیت‌های بدنی و مصرف رزوراترول به نظر می‌رسد که بررسی پژوهشی با هدف تعیین اثر یک دوره فعالیت ورزشی منظم به همراه مصرف مکمل رزوراترول بر روی پرفایل لیپیدی و هم‌چنین آپوتوز سلول‌های بافت قلبی موش‌های مبتلا به

مزمین منجر به آپوتوز سلول‌های کبدی شده که نهایتاً با آسیب‌های جدی در بافت کبدی و مرگ بیمار همراه می‌باشد [۴]. امروز مطالعات متعددی ارتباط بین بیماری NAFLD و افزایش آپوتوز سلول‌های کبدی را در این بیماران نشان دادند. در تازه‌ترین مطالعات توسط حاجی قاسم و همکاران، آپوتوز سلول‌های کبدی به روش تانل در موش‌های مبتلا به NAFLD مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که NAFLD شدیداً با افزایش آپوتوز سلول‌های کبدی همراه می‌باشد [۵]. در تحقیق دیگری لی و همکاران نشان دادند که بیان پروتئین Bax (پروتئین القاءکننده مسیر آپوتوز) و هم‌چنین برخی از کاسپازهای مسئول در مسیر آپوتوز سلولی در بافت کبدی موش‌های مبتلا به NAFLD بسیار افزایش یافته، در حالی‌که بیان Bcl-2 (پروتئین ضد آپوتوز) به طور چشم‌گیری کاهش یافته است [۶]. هم‌چنین پاناسیوک و همکاران گزارش کردند که بیان پروتئین پرو آپوتوتیک P53 در بافت کبدی موش‌های مبتلا به NAFLD به طور چشم‌گیری در مقایسه با گروه نرمال افزایش یافته است. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که بیان پروتئین Bax در بافت کبدی موش‌های مبتلا افزایش معنی‌داری داشته در حالی‌که بیان Bcl-2 به طوری چشم‌گیری کاهش یافته بود [۷]. این نتایج دال بر این می‌باشد که NAFLD با افزایش تجمع چربی و هم‌چنین القاء شدید آپوتوز سلول‌های کبدی همراه می‌باشد. بنابراین، با توجه به مطالعات انجام شده کنترل چربی و از طرفی کاهش آپوتوز سلول‌های کبدی نقش مهمی در کاهش شدت بیماری و بهبود آن خواهد داشت.

مکانیسم اصلی بیماری NAFLD که منجر به اثرات ثانوی از جمله آپوتوز سلول‌های کبدی می‌شود هنوز به خوبی مشخص نشده است. با این حال مطالعات اخیر اظهار کردند که افزایش سطح استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از رادیکال‌های آزاد و التهاب به عنوان مکانیسم‌هایی می‌باشند که با افزایش مرگ سلولی، کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها، و اختلال در پروفایل لیپیدی همراه بوده و سبب پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی می‌گردد [۸]. در این راستا مطالعات زیادی انجام شده است. برای مثال، نیشیدا و همکاران در یک تحقیقی نشان دادند که میزان استرس اکسیداتیو در سلول‌های بافت کبدی موش‌های دچار NAFLD به طور چشم‌گیری افزایش یافته است [۹]. بنابراین، کنترل استرس اکسیداتیو

دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. برنامه تمرینی اصلی به مدت ۸ هفته بود که پروتکل تمرین تداومی بدین صورت انجام شد که در هفته آغازین با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه، زمان ۵ دقیقه شروع و هر هفته به سرعت، ۲-۱ متر بر دقیقه و به زمان نیز ۲-۱ دقیقه افزوده شد به طوری که در هفته چهارم سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه و زمان ۶۰ دقیقه شد. تعداد جلسات ۵ جلسه در هفته بود. برنامه تناوبی شامل پنج جلسه در هر هفته دویدن با شدت ۸۰ تا ۹۰٪ VO_2max روی نوار گردان مخصوص حیوانات آزمایشگاهی بود. مدت زمان دویدن روی نوار گردان ۳۰ دقیقه (۶ دقیقه گرم کردن، ۵۰ تا ۶۰٪ VO_2max)، در هفت ست ۴ دقیقه‌ای با شدت بالا (۸۰ تا ۹۰٪ VO_2max) به دنبال ۳ دقیقه با شدت کم (۵۰ تا ۶۰٪ VO_2max) و ۶ دقیقه فرآیند سرد کردن (۵۰ تا ۶۰ دقیقه VO_2max) بود. شیب نوار گردان در طول ۸ هفته بین ۵ تا ۲۰ درجه متغیر بود [۱۸، ۱۷].

جدول ۱. ترکیبات سازنده رژیم غذایی پرچرب و رژیم استانداردگره

متغیر	رژیم استاندارد (درصد)	رژیم پرچرب (درصد)
چربی	۱۲	۲۲
کربوهیدرات	۵۷	۵۰
پروتئین	۲۸	۲۴
سایر مواد	۳	۴

نحوه مصرف رزوراترول. مکمل رزوراترول بر اساس مطالعات قبلی ما تهیه شد [۵]. به طور خلاصه، میزان ۱ گرم پودر رزوراترول (شرکت نوتراییو آمریکا، با درجه فارماکولوژی و خلوص ۹۹/۸۷٪) را با غلظت ۱۰ mg/ml به عنوان استوک ساخته و سپس برای هر بار تجویز رزوراترول، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷٪ یا DMSO ۱۰٪ با آب به ازاء هر موش تهیه و رزوراترول را در آن معلق نموده و تجویز شد برای کاهش درصد خطا برای کلیه آزمودنی‌ها محلول به صورت یک‌جا تهیه شد. در گروه‌های مکمل و مکمل + تمرین با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن در هر روز راس ساعت ۹ صبح به صورت درون صفاقی به آنان تزریق شد. این روند به مدت ۸ هفته انجام شد.

نمونه‌گیری خونی و بافت کبد. پس از اتمام دوره تحقیق، تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰

کبد چرب غیر الکلی لازم و ضروری باشد. به همین منظور در این تحقیق ابتدا تاثیر NAFLD بر روی پروفایل لیپیدی و هم‌چنین سطوح بیومارکرهای آپوپتوز Bax و Bcl2 در بافت کبدی موش‌های مسن مبتلا به کبد چرب غیر الکلی مورد بررسی قرار گرفته و سپس تاثیر فعالیت‌های بدنی و مصرف مکمل رزوراترول به تنهایی و هم‌چنین به صورت ترکیبی با تمرین ورزشی بر روی بهبود این شرایط مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه. در این مطالعه تجربی، تعداد ۵۶ موش نر مسن نژاد ویستار (با سن ۴۰ تا ۵۰ هفته) با میانگین وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب و وارد مطالعه شدند. موش‌ها به تعداد ۴ عدد در هر قفس از جنس پلی‌کربنات (۱۵ cm × ۱۵ × ۳۰)، در یک شرایط آب و هوایی کنترل شده (دمای ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵±۵٪، و یک سیکل شب و روز ۱۲:۱۲) و با رژیم غذایی استاندارد و آب مورد نیاز در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه آزاد ساری تایید گردید.

تغذیه آزمودنی‌ها و القاء کبد چرب. در ابتدا موش‌ها به دو گروه کنترل و بیمار کبد چرب غیر الکلی تقسیم شدند. موش‌ها در گروه کنترل به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی استاندارد (شامل ۱۲٪ چربی، ۵۷٪ کربوهیدرات، ۲۸٪ پروتئین، و ۳٪ سایر موارد) قرار گرفتند، در حالی که جهت القاء کبد چرب غیر الکلی در موش‌های گروه بیمار، حیوانات به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (شامل ۲۲٪ چربی، ۵۰٪ کربوهیدرات، ۲۴٪ پروتئین و ۴٪ سایر موارد) قرار گرفتند (جدول ۱). پس از آن، موش‌های گروه بیمار با کبد چرب غیر الکلی به ۷ زیرگروه ۷ تایی شامل (۱) گروه بیمار، (۲) گروه دریافت‌کننده سالین، (۳) گروه دریافت‌کننده مکمل رزوراترول، (۴) گروه تمرین تداومی، (۵) گروه تناوبی، (۶) گروه تمرین تداومی-رزوراترول و (۷) گروه تمرین تناوبی-رزوراترول تقسیم شدند.

پروتکل تمرینی. قبل از شروع تمرین اصلی ورزشی، موش‌ها در گروه تمرین و گروه مکمل + تمرین به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل، در یک هفته طی ۵ جلسه، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۸ متر بر

نتایج

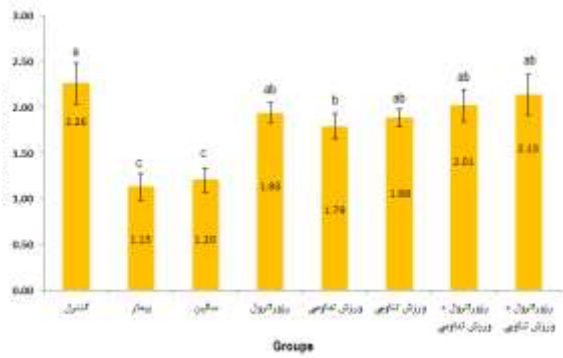
میانگین و انحراف معیار بیومارکرهای پروتئینی آپوتوز در جدول ۲ نشان داده شده است. تفاوت معنی داری در میانگین غلظت پروتئین‌های Bcl2 و Bax بین گروهی مشاهده گردید ($p < 0.001$). گروه بیمار و سالیان به طور معنی داری دارای بیشترین میانگین غلظت پروتئین Bax (به ترتیب برابر با $18/09 \pm 3/19$ و $18/2 \pm 59/43$ نانوگرم در هر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با سایر گروه‌ها بودند ($p < 0.001$), در حالی که غلظت پروتئین Bcl2 در بافت کبدی موش‌های گروه بیمار و سالیان (به ترتیب $1/13 \pm 0/37$ و $1/2 \pm 0/34$ نانوگرم در هر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با سایر گروه‌ها به طور معنی داری کم‌تر بوده است ($p < 0.001$). غلظت پروتئین Bax در گروه‌های رزوراترول + ورزش تناوبی و رزوراترول + ورزش تداومی به ترتیب برابر با $10/41 \pm 2/03$ و $9/2 \pm 96/65$ نانوگرم در هر میلی‌گرم پروتئین بود که در مقایسه با گروه‌های صرفاً مکمل رزوراترول و هم‌چنین صرفاً ورزش تمزینی کاهش بیش‌تری داشت، از طرفی غلظت پروتئین Bcl2 در گروه‌های رزوراترول + ورزش تناوبی و رزوراترول + ورزش تداومی به ترتیب برابر با $2/13 \pm 0/59$ و $2/0 \pm 0/46$ نانوگرم در هر میلی‌گرم پروتئین بود که در مقایسه با گروه‌های صرفاً مکمل رزوراترول و هم‌چنین صرفاً ورزش تمزینی افزایش بیش‌تری داشت.

مصرف مکمل رزوراترول همراه با ورزش تناوبی یا تداومی سبب کاهش معنی داری در میانگین غلظت Bax در بافت کبدی موش‌ها در مقایسه با گروه‌های بیمار و سالیان گردید ($p < 0.001$) (شکل ۱). از طرفی مصرف مکمل رزوراترول همراه با ورزش تناوبی یا تداومی سبب افزایش معنی داری در میانگین غلظت Bcl2 در بافت کبدی موش‌ها در مقایسه با گروه‌های بیمار و سالیان گردید ($p < 0.001$) (شکل ۲). اگر چه گروه ترکیبی رزوراترول + ورزش تمزینی در مقایسه با گروه‌های صرفاً ورزش یا مصرف رزوراترول دارای غلظت پروتئین Bax کم‌تر و یا غلظت پروتئین Bcl2 بیش‌تری بودند، اما این اختلاف چندان معنی دار نبود. از طرفی اختلاف معنی داری در میانگین غلظت Bax و Bcl2 بین گروه‌های رزوراترول + ورزش تمزینی و کنترل مشاهده نگردید (شکل ۱ و ۲). با توجه به نتایج حاصله، یک دوره فعالیت منظم ورزشی تناوبی یا تداومی همراه با رزوراترول سبب بیش‌ترین

میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلوزین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) با نسبت ۵ به ۲ پی‌هوش شدند. نمونه‌های کبد جدا و در دمای ۸۰- سانتی‌گراد ذخیره شده تا برای بررسی‌های بعدی جهت اندازه‌گیری بیومارکرهای آپوتوز مورد مطالعه قرار گیرند. جهت بررسی آپوتوز، بافت کبد (حدود ۲۵۰ میلی‌گرم) در فسفات بافر (با pH برابر با ۷) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه هموژنیزر هموژنیزه شده و سپس در دور ۱۲۰۰۰ rpm با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید [۱۹]. محلول رویی سپس جمع‌آوری و برای بررسی‌های بعدی آپوتوز مورد مطالعه قرار گرفتند. از طرفی نمونه‌گیری خوبی از بطن چپ صورت می‌گرفت و سپس نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز شده تا برای بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

اندازه‌گیری پروتئین‌های BAX و Bcl2. برای بررسی میزان آپوتوز، سطح پروتئین‌های Bax و Bcl2 در بافت کبد تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری این پروتئین‌ها توسط کیت تجاری اختصاصی ELISA و بر اساس دستورات شرکت سازنده آن (ZellBio, Germany) انجام گردید. نتایج حاصل از داده‌ها به صورت نانوگرم به ازاء هر میلی‌گرم بافت ارائه گردید. اندازه‌گیری پروفایل لیپیدی. سطح پروفایل لیپیدی، شامل HDL، LDL، Cho، TG در نمونه‌های سرمی تمام موش‌ها با استفاده از کیت‌های اختصاصی (Rat HDL: R910100112; Rat LDL: R910100123; Rat Cho: R910600110; Rat TG: R910480132) خریداری شده از شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت هر یک از این مارکرهای لیپیدی به صورت mg/dl ارائه شده است.

آنالیزهای آماری. توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. هم‌چنین برای بررسی تغییرات معنی داری هر یک از متغیرهای تحقیق بین گروه‌های مختلف از آزمون تعقیبی توکی در برنامه ANOVA جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معنی داری برای تمام محاسبات $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.



شکل ۲. مقایسه میانگین غلظت Bcl2 بین گروه‌های مختلف. حروف a تا c دال بر وجود معنی داری بین گروه‌ها می باشد (p<0.05). گروه a دارای بیشترین میانگین Bcl2 و گروه c دارای کمترین میانگین Bcl2 می باشند. گروه‌های باحرف ab فاقد تفاوت معنی دار با گروه‌های a و b می باشند (p>0.05)، به عبارتی حدواسط بین گروه‌های a و b هستند.

میانگین و انحراف معیار مربوط به غلظت پروفایل‌های لیپیدی در جدول ۳ نشان داده شده است. گروه بیمار و سالمین به طور معنی داری دارای بیشترین میانگین غلظت سرمی LDL، کلسترول تام و تری گلیسرید در مقایسه با سایر گروه‌ها بودند (p<0.0001)، در حالی که غلظت سرمی HDL در بافت کبدی موش‌های گروه بیمار (23/24±5/41 میلی گرم در هر دسی لیتر) و سالمین (22/98±5/5 میلی گرم در هر دسی لیتر) در مقایسه با سایر گروه‌ها به طور معنی داری کم تر بوده است (p<0.0001). میانگین غلظت LDL، کلسترول تام و تری گلیسرید در گروه‌های روزراترول + تمرین ورزشی در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش کمتری نشان داده بود، در حالی که غلظت HDL افزایش بیش تری در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان داد.

ورزش	± ۲۰/۸۷	± ۲۱/۱۱	± ۵/۴۸	± ۴/۹۱
تداومی	۱۶۴/۹۲	۹۶/۹۴	۲۸/۵۲	۳۹/۵۸
ورزش تناوبی	± ۱۹/۲۴	± ۱۵/۲۹	± ۶/۰۴	± ۶/۲۱
روزراترول +	۱۵۶/۰۷	۹۴/۱۸	۳۰/۹۷	۳۷/۵۴
ورزش	± ۱۵/۰۹	± ۱۲/۵۵	± ۵/۵۸	± ۷/۵۷
تداومی	۱۴۰/۶۱	۹۰/۳۴	۳۳/۳۲	۳۱/۳۱
ورزش تناوبی	± ۱۳/۰۲	± ۱۳/۱۸	± ۷/۵۸	± ۶/۹۳
روزراترول +	۱۳۳/۹۲	۸۷/۹۴	۳۴/۵۷	۲۹/۵۷
مقدار p	<0/000	<0/000	<0/000	<0/000

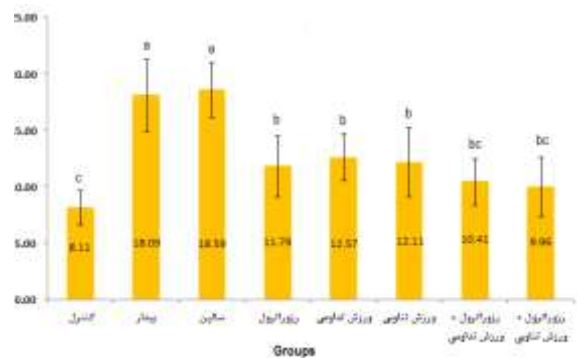
*مقدار p کمتر از 0/05 از لحاظ آماری معنی دار می باشد.

کاهش سطح Bax و بیشترین افزایش سطح Bcl2 در موش‌های مسن کبد چرب غیر الکلی گردید.

جدول ۲. مقایسه میانگین و انحراف معیار غلظت Bax و Bcl2 در گروه‌های مختلف

گروه	Bcl2	Bax
کنترل	۲/۲۶ ± ۰/۵۹	۸/۱۱ ± ۱/۵۱
بیمار	۱/۱۳ ± ۰/۳۷	۱۸/۰۹ ± ۳/۱۹
سالمین	۱/۲ ± ۰/۳۴	۱۸/۵۹ ± ۲/۴۳
روزراترول	۱/۹۳ ± ۰/۲۹	۱۱/۷۹ ± ۲/۶۸
ورزش تناوبی	۱/۷۹ ± ۰/۳۷	۱۲/۵۷ ± ۲/۰۸
ورزش تناوبی	۱/۸۸ ± ۰/۲۵	۱۲/۱۱ ± ۳/۰۵
روزراترول + ورزش	۲/۰۱ ± ۰/۴۶	۱۰/۴۱ ± ۲/۰۳
تداومی		
روزراترول + ورزش	۲/۱۳ ± ۰/۵۹	۹/۹۶ ± ۲/۶۵
تناوبی		
مقدار p	<0/0001	<0/0001

*مقدار p کمتر از 0/05 از لحاظ آماری معنی دار می باشد.



شکل ۱. مقایسه میانگین غلظت Bax بین گروه‌های مختلف. حروف a تا c دال بر وجود معنی داری بین گروه‌ها می باشد (p<0.05). گروه a دارای بیشترین میانگین Bax و گروه c دارای کمترین میانگین Bax می باشند. گروه‌های باحرف bc فاقد تفاوت معنی دار با گروه‌های b و c می باشند (p>0.05)، به عبارتی حدواسط بین گروه‌های b و c هستند.

جدول ۳. مقایسه میانگین و انحراف معیار غلظت پروفایل‌های لیپیدی در گروه‌های مختلف

گروه	TG	Cho	HDL	LDL
کنترل	± ۱۷/۶	± ۱۰/۲۵	± ۵/۷۶	± ۵/۲۷
بیمار	۱۰۴/۶۴	۸۱/۹۱	۳۶/۵۴	۲۳/۶۴
سالمین	± ۲۰/۰۲	± ۱۰/۸	± ۵/۴۱	± ۸/۹۴
روزراترول	۲۲۸/۱۸	۱۲۴/۶۷	۲۳/۲۴	۴۸/۹
ورزش تناوبی	± ۱۸/۹۴	± ۱۳/۲۳	± ۵/۵	± ۹/۳۲
روزراترول +	۲۲۷/۴۲	۱۲۵/۳۸	۲۲/۹۸	۵۰/۷
ورزش	± ۲۵/۷	± ۱۴/۰۳	± ۴/۹۸	± ۷/۰۱
تداومی	۱۴۹/۹	۹۸/۹۸	۳۱/۱۵	۳۴/۲۴

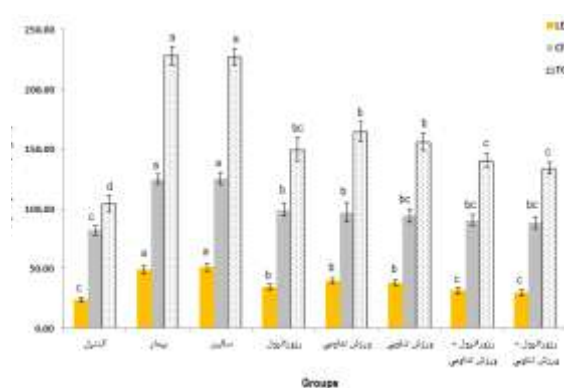
تفاوت معنی‌داری در میانگین سرمی غلظت HDL بین گروه‌های مکمل رزوراتول، تمرین تناوبی و رزوراتول + تمرین ورزشی مشاهده نشد. با توجه به نتایج حاصله، یک دوره فعالیت منظم ورزشی تناوبی یا مداومی همراه با رزوراتول سبب بیش‌ترین کاهش سطح LDL، تری گلیسرید و کلسترول و بیش‌ترین افزایش سطح HDL در موش‌های مسن کبد چرب غیر الکلی گردید (شکل ۳ و ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

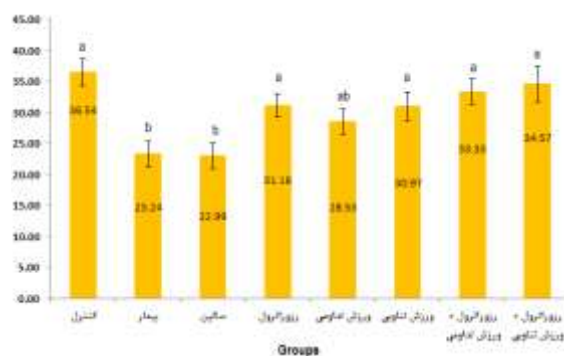
در این تحقیق، تاثیر تجویز رزوراتول به تنهایی و یا همراه با تمرین ورزشی تناوبی و مداومی بر روی غلظت بیومارکرها آپوتوز بافت کبدی شامل پروتئین‌های Bax و Bcl2 و هم‌چنین غلظت سرمی پروفایل لیپیدی در موش‌های نر دچار NAFLD مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج تحقیق ما نشان داده است که غلظت پروتئین Bax در بافت کبد موش‌های مبتلا به NAFLD به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است، در حالی‌که میانگین غلظت Bcl2 به طور چشم‌گیری کاهش یافته بود که دال بر افزایش فرآیند آپوتوز در بافت کبدی موش‌های دچار NAFLD می‌باشد. مطالعات قبلی نشان دادند که افزایش نسبت Bax به Bcl2 با افزایش آپوتوز سلولی همراه می‌باشد [۲۰]، در حالی‌که که کاهش نسبت Bax به Bcl2 با مهار سیتوکروم C سبب کاهش آپوتوز می‌گردد [۲۱]. بنابراین افزایش سطح Bax و کاهش Bcl2 در بافت کبدی بیماران NAFLD دال بر افزایش میزان آپوتوز سلولی می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر دال بر این می‌باشد که سلول‌های کبدی در موش‌های مبتلا به NAFLD دچار آپوتوز شدید می‌باشند. علاوه بر این، در مطالعه کنونی افزایش معنی‌داری در میانگین غلظت سرمی LDL، TG و کلسترول در موش‌های مبتلا به NAFLD در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید، در حالی‌که غلظت سرمی HDL به شدت کاهش یافته بود. نتایج تحقیق ما قابل مقایسه با پژوهش‌های قبلی می‌باشد که افزایش میزان آپوتوز سلول‌های کبدی را همراه با افزایش سطح سرمی TG، کلسترول، LDL و VLDL و کاهش HDL را در بیماران مبتلا به NAFLD گزارش کردند [۲۲، ۲۳].

اگر چه مطالعات بسیار گسترده‌ای افزایش میزان آپوتوز سلول‌های کبدی و هم‌چنین اختلال پروفایل لیپیدی را در بیماران مبتلا به NAFLD نشان دادند، اما

شکل ۳ نشان می‌دهد که مصرف مکمل رزوراتول همراه با ورزش تناوبی یا مداومی سبب کاهش معنی‌داری در میانگین غلظت سرمی LDL، کلسترول و تری گلیسرید در بافت کبدی موش‌ها در مقایسه با گروه‌های بیمار و سالمین گردید ($p < 0.001$). علاوه بر این، تجویز رزوراتول به تنهایی و یا در ترکیب با ورزش تناوبی یا مداومی سبب افزایش معنی‌داری در میانگین غلظت HDL در بافت کبدی موش‌ها در مقایسه با گروه‌های بیمار و سالمین گردید ($p < 0.001$) (شکل ۴).



شکل ۳. مقایسه میانگین LDL، Cho و TG بین گروه‌های مختلف. حروف a تا d دال بر وجود معنی‌داری بین گروه‌ها می‌باشد ($p < 0.05$). گروه a دارای بیشترین میانگین غلظت و گروه d دارای کمترین میانگین غلظت می‌باشند. گروه‌های باحرف bc فاقد تفاوت معنی‌دار با گروه‌های b و c می‌باشند ($p > 0.05$).



شکل ۴. مقایسه میانگین غلظت HDL بین گروه‌های مختلف. حروف a تا b دال بر وجود معنی‌داری بین گروه‌ها می‌باشد ($p < 0.05$). گروه a دارای بیشترین میانگین غلظت و گروه b دارای کمترین میانگین غلظت می‌باشند. گروه‌های باحرف ab فاقد تفاوت معنی‌دار با گروه‌های a و b می‌باشند ($p > 0.05$).

اختلاف معنی‌داری در میانگین غلظت LDL، کلسترول و تری گلیسرید بین گروه‌های مکمل رزوراتول و تمرین تناوبی و مداومی مشاهده نگردید (شکل ۳).

استرس اکسیداتیو القاء شده با ROS و التهاب به عنوان یکی از دلایل اصلی پاتوژنز بیماری NAFLD محسوب می‌گردند که می‌تواند نهایتاً منجر به آپیتوز و مرگ سلول‌های کبدی شود.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق و پژوهش‌های قبلی، به نظر می‌رسد که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها یا داروهایی که سبب محافظت سلول‌های کبدی در برابر استرس اکسیداتیو شوند، کمک زیادی به کاهش شدت بیماری و آپیتوز سلول‌های کبدی داشته باشند. به همین منظور در تحقیق کنونی، اثرات درمانی رزوراتول به تنهایی و یا همراه با ورزش‌های تناوبی و تداومی در درمان شدت بیماری NAFLD بررسی گردید. نتایج تحقیق ما نشان داد که آسیب کبدی در موش‌های دریافت‌کننده رزوراتول به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه بیمار کاهش یافته بود. این اثرات با افزایش معنی‌داری در سطح سرمی HDL و هم‌چنین کاهش چشم‌گیری در سطح سرمی TG، LDL و کلسترول تام بوده است. از طرفی میزان پروتئین Bax بافت کبد به طور معنی‌داری کاهش یافته بود، در حالی‌که که تجویز ترکیبی رزوراتول و تمرین ورزشی سبب افزایش معنی‌داری در سطح Bcl2 شده بود. اگر چه تجویز رزوراتول و یا هر یک تمرین‌های ورزشی به تنهایی سبب بهبود در پروفایل لیپیدی و هم‌چنین کاهش آپیتوز گردید، اما تجویز ترکیبی رزوراتول همراه با ورزش تناوبی یا تداومی تاثیر درمانی قوی‌تری نشان داده بود.

تاکنون مطالعات متعددی تاثیر درمانی رزوراتول را بررسی کردند. برای مثال در مطالعه قبلی ما، تاثیر تجویز رزوراتول به تنهایی و یا همراه با هر یک از تمرین‌های ورزشی بر روی تعداد سلول‌های آپیتوز شده سلول‌های کبدی و هم‌چنین مارکرهای استرس اکسیداتیو و التهابی مورد بررسی قرار گرفت [۵]. نتایج تحقیق قبلی ما نشان داد که تجویز رزوراتول، به ویژه به صورت ترکیبی با ورزش‌های تناوبی و تداومی، با افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT و هم‌چنین سطح IL-10 همراه بوده است، در حالی‌که سطح TNF-a، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تعداد سلول‌های آپیتوز کبدی به طور معنی‌داری کاهش یافته بود [۵]. اخیراً در یک تحقیقی وانگ و همکاران (۲۰۱۸) نشان داده‌اند که رزوراتول با کاهش تولید ROS و بیان سیتوکاین‌های التهابی، و هم‌چنین افزایش مدیاتورهای ضدالتهابی و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کاهش التهاب و استرس

مکانیسم واقعی این ناهنجاری‌ها هنوز به خوبی شناخته نشده است. به نظر می‌رسد که افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد و التهاب یکی از مکانیسم‌های اصلی دخیل در پاتوژنز بیماری NAFLD می‌باشد. اخیراً برخی مطالعات افزایش سطح استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی را در بافت کبدی بیماران مبتلا به NAFLD نشان دادند [۲۴]. برای مثال، اخیراً در یک مطالعه‌ای نشان دادیم که بافت کبد در موش‌های NAFLD به طور معنی‌داری دچار آسیب‌های ساختاری نظیر افزایش التهاب و استرس اکسیداتیو می‌گردد [۵]. علاوه بر این، در مطالعه قبلی ما کاهش معنی‌داری در میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در کبد موش‌های مبتلا به بیماری کبد چرب غیرالکلی مشاهده گردید [۵]. در یک تحقیقی، ادین و همکاران (۲۰۱۴) کاهش معنی‌داری را در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و غیر آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و هم‌چنین گلوکاتایون احیاء شده (GSH) در کبد موش‌های مبتلا به NAFLD نشان دادند [۲۵]. در مطالعه دیگری، دینگ و همکاران (۲۰۱۶) افزایش معنی‌داری را در غلظت مالون دی‌آلدئید (بیومارکر پراکسیداسیون لیپیدی) و هم‌چنین سطح ROS در بافت کبد موش‌های مبتلا به NAFLD مشاهده کردند، در حالی‌که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به شدت کاهش یافته بود [۲۶]. اخیراً در یک مطالعه‌ای حاجی‌قاسم و همکاران (۲۰۱۸) افزایش معنی‌داری را در سطح TNF-a در کبد موش‌های مبتلا به NAFLD مشاهده کردند، در حالی‌که سطح IL-10 به طور معنی‌داری کاهش یافته بود [۵]. از آنجایی که IL-10 دارای نقش ضد التهابی و TNF-a سطح دارای نقش القاء التهاب می‌باشند، بنابراین کاهش سطح IL-10 و از طرفی افزایش سطح TNF-a در کبد موش‌های مبتلا به NAFLD احتمالاً یکی از دلایل افزایش التهاب در آن‌ها می‌باشد. به طور مشابهی، ادین و همکاران (۲۰۱۴) افزایش سطح مدیاتورهای التهابی نظیر TNF-a و TNF-b را در کبد موش‌های مبتلا به NAFLD مشاهده کردند که با افزایش فیلتراسیون سلول‌های التهابی و هم‌چنین افزایش معنی‌داری در سطح سرمی آنزیم‌های کبدی (شامل AST، ALT، ALP)، لپتین، کلسترول، تری‌گلیسرید و مالون دی‌آلدئید همراه بود [۲۵]. بنابراین، این نتایج دال بر این می‌باشد که

ماکروفازها می‌گردد، در حالی که تجویز رزوراتول به تنهایی در جهت کاهش تراوش و فعال‌سازی ماکروفازها کافی نمی‌باشد [۳۶]. مطالعه دیگری نشان داد که درمان ترکیبی با رزوراتول و تمرین‌های ورزشی خواص ضدپیری داشته و سبب حفظ فعالیت بالای GSH، آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون-S-ترانسفراز در حیوانات مسن می‌گردد [۳۷]. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و پژوهش‌های قبلی، ما اظهار می‌کنیم که درمان ترکیبی با رزوراتول و تمرین ورزشی، به ویژه تمرین ورزشی تناوبی، احتمالاً از طریق کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد، بهبود آنتی‌اکسیدان‌ها، کاهش التهاب و کاهش آپوپتوز می‌تواند سبب بهبود شدت بیماری در افراد مبتلا به NAFLD گردد. هر چند یکی از محدودیت‌های این تحقیق عدم بررسی ارتباط بین NAFLD با بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و همچنین تاثیر تجویز رزوراتول به تنهایی و یا توأم با ورزش بر روی وضعیت اکسیداتیوی بوده است که می‌تواند در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرند.

یافته‌های تحقیق ما نشان می‌دهد که بیماری NAFLD شدیداً با افزایش آپوپتوز سلول‌های کبدی و اختلال پروفایل لیپیدی همراه می‌باشد. اگر چه تجویز رزوراتول می‌تواند به عنوان یک ترکیب با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بالا در بیماران NAFLD مورد استفاده قرار گیرد، اما درمان ترکیبی رزوراتول و تمرین ورزشی تناوبی یا تداومی، می‌تواند احتمالاً از طریق کاهش بیش‌تر استرس اکسیداتیو و التهاب، تعداد سلول‌های آپوپتوز شده، سبب تعادل پروفایل لیپیدی و بهبود NAFLD گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق توسط دانشکده فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری حمایت گردید. نویسندگان از تمام اعضاء مرکز فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تقدیر و تشکر می‌کنند.

منابع

- [1] Hardy T, McPherson S. Editorial: NAFLD in Asia-clinical associations with advanced disease become clearer. *Aliment Pharmacol Ther* 2018; 47: 1035-1036.
- [2] Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EM. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol* 2015; 7: 846-858.
- [3] Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: S186-190.

اکسیداتیو می‌گردد [۲۷]. همچنین پالاکز-سوروبل و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که رزوراتول سبب افزایش بیان ژن مربوط به IL-10 می‌گردد، در حالی که سبب کاهش بیان ژن مربوط به TNF- α می‌شود [۲۸]. اخیراً در یک مطالعه‌ای ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که رزوراتول سبب افزایش بیان سیتوکاین‌های ضد التهابی نظیر IL-10 می‌گردد، در حالی که رونویسی از سیتوکاین‌های پیش التهابی را به شدت کاهش می‌دهد [۲۹]. افزایش بیان سیتوکاین‌های ضدالتهابی نظیر IL-4 نیز توسط چندین مطالعه گزارش گردید [۳۰]. اثر محافظتی رزوراتول علیه سایر مدیاتورهای التهاب نظیر IL-6، IL-1، IL- β ، IL- γ ، IL-5، IL-33 [۳۱]، نیتریک اکسید (NO)، نیتریک اکسید سنتاز القاء‌پذیر (iNOS)، سیکلوآکسیژناز-2 (COX-2) و ماستاتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) [۳۲] نیز در مطالعات قبلی گزارش گردید. مطالعات بسیار زیادی هم‌چنین گزارش کردند که رزوراتول از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی بالای خود سبب محافظت سلول‌های کبدی می‌گردد [۱۵]. در یک مطالعه‌ای اخیراً البه و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که رزوراتول از طریق کاهش MDA، فعالیت iNOS و افزایش محتوای SOD، CAT، GSH در بافت کبد، سبب کاهش هیپاتوتوکسیسیته ناشی از استافینوفن می‌گردد [۳۳].

چندین مطالعه تاکنون تاثیر درمانی ترکیب رزوراتول و انواعی از ورزش‌ها را بر روی بهبود عملکرد کبد در بیماران NAFLD نیز مورد بررسی قرار دادند. برای مثال، در یک مطالعه کارآزمایی بالینی، فقیه‌زاده و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که تجویز رزوراتول (۵۰۰ میلی‌گرم در هر روز برای ۱۲ هفته) همراه با فعالیت فیزیکی با کاهش چشم‌گیری در سطح آنزیم کبدی آلانین ترانسفراز (ALT)، سیتوکاین‌های التهابی، فعالیت فاکتور هسته‌ای kappaB، سطح سرمی سیتوکاین-18، و همچنین کاهش سیروز کبدی می‌گردد [۳۴]. در تحقیق دیگری تانگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ترکیب رزوراتول و تمرین ورزشی سبب افزایش فعالیت چندین آنتی‌اکسیدان شامل SOD، CAT، گلوکوتایون پراکسیداز، گلوکوتایون ردوکتاز، گلوکوتایون-S-ترانسفراز، تیوردوکسین ردوکتاز، NADH سیتوکروم B5-ردوکتاز و پذیرنده NAD(P)H-کوئینون اکسیدوردوکتاز می‌گردد [۳۵]. در مطالعه دیگری جئونگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تمرین ورزشی متوسط و ملایم سبب مهار تراوش

- corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* 2000; 14: 779-790.
- [21] Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 93-107.
- [22] Luukkonen PK, Zhou Y, Nidhina Haridas PA, Dwivedi OP, Hyotylainen T, Ali A, et al. Impaired hepatic lipid synthesis from polyunsaturated fatty acids in TM6SF2 E167K variant carriers with NAFLD. *J Hepatol* 2017; 67: 128-136.
- [23] Ichino N, Osakabe K, Sugimoto K, Suzuki K, Yamada H, Takai H, et al. The NAFLD index: a simple and accurate screening tool for the prediction of non-alcoholic fatty liver disease. *Rinsho Byori* 2015; 63: 32-43.
- [24] Kumar A, Sharma A, Duseja A, Das A, Dhiman RK, Chawla YK, et al. Patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) have higher oxidative stress in comparison to chronic viral hepatitis. *J Clin Exp Hepatol* 2013; 3: 12-18.
- [25] El-Din SH, Sabra AN, Hammam OA, Ebeid FA, El-Lakkany NM. Pharmacological and antioxidant actions of garlic and/or onion in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *J Egypt Soc Parasitol* 2014; 44: 295-308.
- [26] Ding C, Zhao Y, Shi X, Zhang N, Zu G, Li Z, et al. New insights into salvianolic acid A action: Regulation of the TXNIP/NLRP3 and TXNIP/ChREBP pathways ameliorates HFD-induced NAFLD in rats. *Sci Rep* 2016; 6: 28734.
- [27] Wang H, Jiang T, Li W, Gao N, Zhang T. Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Toxicol Lett* 2018; 282: 100-108.
- [28] Palacz-Wrobel M, Borkowska P, Paul-Samojedny M, Kowalczyk M, Fila-Danilow A, Suchanek-Raif R, et al. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 1205-1212.
- [29] Zheng Y, Zhao Z, Wu W, Song C, Meng S, Fan L, et al. Effects of dietary resveratrol supplementation on hepatic and serum pro-/anti-inflammatory activity in juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev Comp Immunol* 2017; 73: 220-228.
- [30] Wang D, Li SP, Fu JS, Bai L, Guo L. Resveratrol augments therapeutic efficiency of mouse bone marrow mesenchymal stem cell-based therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Dev Neurosci* 2016; 49: 60-66.
- [31] Chen Q, Wang T, Li J, Wang S, Qiu F, Yu H, et al. Effects of natural products on fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients* 2017; 9: 2.
- [32] Wang ZM, Chen YC, Wang DP. Resveratrol. A natural antioxidant, protects monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain in rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 83: 763-770.
- [33] Elbe H, Gul M, Cetin A, Taslidere E, Ozyalin F, Turkoz Y, et al. Resveratrol reduces light and electron microscopic changes in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats: Role of iNOS expression. *Ultrastruct Pathol* 2017; 1-10.
- [34] Faghihzadeh F, Adibi P, Rafiei R, Hekmatdoost A. Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Res* 2014; 34: 837-843.
- [35] Tung BT, Rodriguez-Bies E, Talero E, Gamero-Estevéz E, Motilva V, Navas P, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver. *Exp Gerontol* 2015; 64: 1-7.
- [36] Jeong JH, Lee YR, Park HG, Lee WL. The effects of either resveratrol or exercise on macrophage infiltration and switching from M1 to M2 in high fat diet mice. *J Exerc Nutrition Biochem* 2015; 19: 65-72.
- [37] Tung BT, Rodriguez-Bies E, Ballesteros-Simarro M, Motilva V, Navas P, Lopez-Lluch G. Modulation of endogenous antioxidant activity by resveratrol and exercise in mouse liver is age dependent. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69: 398-409.
- [4] Eizadi M, Ghasemi Shob M, Rashidi M. Effects of whey protein supplementation after high intensity eccentric contraction on liver enzymes in non athletic young men. *Koomesh* 2018; 20: 15-24. (Persian).
- [5] Hajighasem A, Farzanegi P, Mazaheri Z. Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in the liver of old rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Physiol Biochem* 2018; 1-8.
- [6] Li CP, Li JH, He SY, Li P, Zhong XL. Roles of fas/fasL, Bcl-2/Bax, and caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Genet Mol Res* 2014; 13: 3991-3999.
- [7] Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6198-6202.
- [8] Hena-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammation-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 2012; 482: 179-185.
- [9] Nishida N, Yada N, Hagiwara S, Sakurai T, Kitano M, Kudo M. Unique features associated with hepatic oxidative DNA damage and DNA methylation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31: 1646-1653.
- [10] Inoue H, Kishimoto A, Ushikoshi-Nakayama R, Hasaka A, Takahashi A, Ryo K, et al. Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjogren's syndrome. *J Clin Biochem Nutr* 2016; 59: 107-112.
- [11] Eslahi M, Mohammadifar M, Taghizadeh M, Khamechian T, Mehran M, Talaei SA. Effects of ziziphus jujube mill, cynara scolymus L. and and cichorium intybus L. combination extract on non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Koomesh* 2018; 20: 741-747. (Persian).
- [12] Lanzilli G, Cottarelli A, Nicotera G, Guida S, Ravagnan G, Fuggetta MP. Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation. *Inflammation* 2012; 35: 240-248.
- [13] Wenbin Z, Guojun G. Resveratrol ameliorates diabetes-induced renal damage through regulating the expression of TGF-beta1, collagen IV and Th17/Treg-related cytokines in rats. *West Indian Med J* 2014; 63: 20-25.
- [14] Voduc N, la Porte C, Tessier C, Mallick R, Cameron DW. Effect of resveratrol on exercise capacity: a randomized placebo-controlled crossover pilot study. *Appl Physiol Nutr Metab* 2014; 39: 1183-1187.
- [15] Sun S, Zhang M, Yang Q, Shen Z, Chen J, Yu B, et al. Resveratrol suppresses lipoprotein-associated phospholipase A2 expression by reducing oxidative stress in macrophages and animal models. *Mol Nutr Food Res* 2017; 61: 10.
- [16] Zhao Y, Song W, Wang Z, Wang Z, Jin X, Xu J, et al. Resveratrol attenuates testicular apoptosis in type 1 diabetic mice: Role of Akt-mediated Nrf2 activation and p62-dependent Keap1 degradation. *Redox Biol* 2018; 14: 609-617.
- [17] Batacan RB, Jr, Duncan MJ, Dalbo VJ, Connolly KJ, Fenning AS. Light-intensity and high-intensity interval training improve cardiometabolic health in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2016; 41: 945-952.
- [18] 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. *Physiol Behav* 2017; 184: 6-11.
- [19] Ma Z, Chu L, Liu H, Wang W, Li J, Yao W, et al. Beneficial effects of paeoniflorin on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Sci Rep* 2017; 7: 44819.
- [20] Almeida OF, Conde GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, et al. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of

Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis and lipid profiles in the liver of rats with nonalcoholic fatty liver disease

Amir Haj Ghasem (Ph.D student)¹, Parvin Farzanegi (Ph.D)^{*1}, Zohreh Mazaheri (Ph.D)²

¹ -Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran

² -Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 9112230233 parvin.farzanegi@gmail.com

Received: 1 May 2018; Accepted: 24 Oct 2018

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic liver disorders. In this study, effect of resveratrol supplementation alone or in combination with interval and continuous exercises was considered on hepatic cells apoptosis and serum lipid profiles in rats with NAFLD.

Materials and Methods: Old rats were divided into two groups, including control and NAFLD. The NAFLD rats were then randomly divided into seven experimental sub-groups including NAFLD, NAFLSD + saline, NAFLD + resveratrol (RSV), NAFLD + continuous exercise, NAFLD + interval exercise, NAFLD + continuous exercise + RSV, and NAFLD + interval exercise + RSV. Apoptosis biomarkers, including liver Bax and Bcl2 proteins, and serum lipid profiles including HDL, LDL, total cholesterol (Cho) and triglyceride (TG), were measured using specific ELISA kits.

Results: Resveratrol supplementation alone or in combination with exercise training significantly decreased the serum LDL, Cho and TG levels ($p < 0.05$), but significantly increased the HDL level ($p < 0.05$). RSV alone or in combination with interval and continuous exercise programs significantly decreased Bax protein content ($p < 0.001$), but significantly increased the Bcl2 level ($p < 0.001$).

Conclusion: NAFLD is powerfully associated with the liver cells apoptosis and abnormality in lipid profiles. Although, resveratrol supplementation alone has an anti-apoptotic and reducing effect on lipid profiles, the combined therapy with exercise training can be more effective.

Keywords: Apoptosis, Oxidative Stress, Non-alcoholic Fatty Liver, Lipid, Exercise, Resveratrol