



اثر تمرین هوازی تداومی و تناوبی همراه با مصرف مکمل سیلیمارین بر میزان آنزیم‌های کبدی و تغییرات بافت کبد در موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب غیر الکلی القاء شده با دگزامتازون

فاطمه مختاری^۱، الهه طالبی گرکانی^{۲*}، خدیجه نصیری^۳، ابوالفضل اکبری^۴

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۹/۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۵

چکیده

هدف: هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید همراه با مصرف سیلیمارین بر سطوح سرمی آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و تغییرات بافت کبد موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب بود.

روش کار: ۴۹ سر موش صحرایی نر ($229/71 \pm 18/94$ گرم) در ابتدا به ۲ گروه کنترل سالم (۷ سر) و در معرض دگزامتازون (۴۲ سر) تقسیم شدند. جهت القاء کبد چرب مقدار ۱۰ میلی‌گرم دگزامتازون به ازای هر کیلو گرم از وزن بدن به مدت ۶ روز و بصورت زیرجلدی تزریق شد. سپس این حیوانات به ۶ گروه (۷ سر در هر گروه) تقسیم شدند: ۱- کنترل بیمار ۲- سیلیمارین ۳- تمرین تناوبی ۴- تمرین تناوبی+سیلیمارین ۵- تمرین تداومی ۶- تمرین تداومی+سیلیمارین. محلول سیلیمارین روزانه به مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن گاوآژ شد. گروه‌های تمرینی به مدت ۸ هفته (تواتر ۵ جلسه در هفته) تمرین تداومی (۵۴ دقیقه با سرعت ۲۰ متر در دقیقه) و تمرین تناوبی با شدت بالا (۶ وهله ۳ دقیقه‌ای با سرعت ۴۰ متر در دقیقه و ۳ دقیقه ریکاوری فعال با سرعت ۲۰ متر در دقیقه) با شیب ۱۵ درجه را روی نوارگردان انجام دادند. مقاطع بافت کبد با روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی و ارزیابی و سطوح سرمی ALT و AST به روش رنگ سنجی آنزیمی اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل یافته‌ها با آزمون تحلیل واریانس دو طرفه صورت گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های بافت کبد گروه دگزامتازون، حاکی از استئاتوز کبدی در مقایسه با ساختار طبیعی آن در گروه کنترل بود. مصرف سیلیمارین و انجام تمرینات ورزشی تناوبی و تداومی در طی هشت هفته توانست تغییرات بافتی را به طور قابل توجهی در حیوانات بیمار در مقایسه با گروه کنترل بهبود دهد. اثر تعاملی مصرف مکمل سیلیمارین و تمرین بر سطوح سرمی AST و ALT معنادار نبود. لیکن مصرف مکمل سیلیمارین موجب کاهش معنادار سطوح آنزیم کبدی AST ($p=0/009$) و ALT ($p=0/017$) گردید. همچنین سطوح آنزیم آسپارات آمینو ترانسفراز در گروه تمرین تناوبی نسبت به گروه کنترل بطور معناداری بالاتر بود ($p=0/002$). مقدار این آنزیم در گروه تمرین تناوبی+سیلیمارین نیز نسبت به گروه تمرین تناوبی بطور معناداری کاهش یافته بود ($p=0/001$).

نتیجه‌گیری: مصرف مکمل سیلیمارین و تمرین هوازی (تداومی و تناوبی) بصورت مجزا و در ترکیب با یکدیگر می‌تواند موجب بهبود وضعیت بافت کبد موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب غیر الکلی القاء شده با دگزامتازون شود. به نظر می‌رسد اثر ترکیبی تمرین و سیلیمارین در بهبود تغییرات بافتی کبد موثرتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی شدید، تمرین تداومی، سیلیمارین، آسپارات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، هیستولوژی

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، ۲. دانشیار دانشگاه مازندران، عضو قطب پایش سلامت و ورزشی و پویش قهرمانی،

۳. استادیار دانشگاه مازندران، ۴. دانش آموخته فیزیولوژی ورزش

*نویسنده مسئول: E.talebi@umz.ac.ir

مقدمه

کبد نقش مهمی در متابولیسم لیپیدها، ورود اسیدهای چرب آزاد و فرایند ساخت، ذخیره و خروج چربی ها دارد. اختلال در هر یک از این فرایندها می تواند منجر به ایجاد بیماری کبد چرب شود (۱). بیماری کبد چرب غیرالکلی به تجمع بیش از ۵ درصد چربی در بافت کبد اشاره دارد و از استئاتوزیس ساده کبدی تا درجات مختلفی از التهاب و نکروز قابل مشاهده است (۲). آنزیم های کبدی مانند آسپاراتات آمینوترانسفراز^۱ (AST) و آلانین ترانس آمیناز^۲ (ALT) از جمله آنزیم های نشانگر برای عملکرد و یکپارچگی کبد هستند که برای تشخیص تظاهرات بالینی حاصل از سمیت حاد یا مزمن کبدی استفاده می شوند (۳). با توجه به نقش محوری کبد در متابولیسم بدن به نظر می رسد رویکرد اولیه در پیشگیری از وقوع این پیامدها، اصلاح مسیرهای متابولیکی از طریق تغییر رژیم غذایی، مصرف مکمل های گیاهی و انجام فعالیت بدنی باشد (۴).

مطالعات بالینی نشان می دهد که تمرینات ورزشی با شدت متوسط می تواند استئاتوز کبدی را در بزرگسالان کاهش دهد (۵،۶). در واقع چهار هفته تمرین ورزشی با شدت

متوسط (۷۰ درصد VO₂peak) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در روز باعث کاهش اسیدهای چرب آزاد سرم، چربی احشایی و محتوای تری گلیسرید کبدی در مردان و زنان چاق مبتلا به استئاتوز کبدی شده است (۵). همچنین نشان داده شده است که تمرینات ورزشی تناوبی با شدت بالا عملکرد کبد و متابولیسم گلوکز را بهبود می بخشد (۷،۸). لیکن در خصوص اثرات این نوع تمرین بر کبد چرب غیر الکلی و مقایسه آن با تمرینات تداومی مطالعات محدودی انجام شده است. اخیراً استفاده از گیاهان دارویی و فرآورده های آن به دلیل در دسترس بودن، صرفه اقتصادی و عوارض جانبی کمتر به منظور پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری ها و اختلالات مورد توجه قرار گرفته است (۹). فرآورده های حاصل از گیاهان دارویی با داشتن ویژگی ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی می توانند در بهبود بیماری ها از جمله بیماری های کبدی موثر باشند. امروزه گیاهان بسیاری با خاصیت حفاظت کبدی شناخته شده است. خار مریم^۳ از جمله این گیاهان است که از آن به عنوان افزایش دهنده جریان صفرا یاد می کنند. عصاره ی خار مریم شامل مواد شیمیایی متنوعی از جمله فلاوولیگان ها است که در

3. Silybum Marianum

1. Aspartate Aminotransferase
2. Alanine Aminotransferase

در مردان مبتلا به دیابت نوع ۲ شده است (۱۹). بنابراین در مطالعه حاضر تاثیر تمرینات هوازی (تداومی و تناوبی با شدت بالا) به همراه مصرف سیلیمارین بر آنزیم های کبدی و تغییرات بافت شناختی کبد موش-های صحرایی در معرض دگزامتازون مورد بررسی قرار گرفته است.

روش پژوهش

آزمودنی های پژوهش: چهل و نه سر موش صحرایی نر ویستار با میانگین وزن $(229/18 \pm 71/94)$ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری و به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه مازندران انتقال یافت. کلیه مراحل پژوهش براساس راهنمای استفاده و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی تایید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه مازندران با شناسه "IR.UMZ.REC.1399.018" اجرا شد. حیوانات مورد استفاده در این پژوهش در شرایط استاندارد آزمایشگاهی کنترل شده (22 ± 1) درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ (ساعت) در قفس های استاندارد (۴ سر در هر قفس) از جنس پلی کربنات به ابعاد $20 \times 27 \times 47$

مجموع سیلیمارین^۱ نامیده می شود (۱۰). سیلیمارین مخلوطی از فلاونوئیدهایی است که اثرات محافظت کبدی و آنتی اکسیدانی آن نشان داده شده است (۱۱). سیلیمارین در درمان مسمومیت و دیگر بیماری های مزمن کبدی موثر می باشد (۱۲). مطالعاتی وجود دارد که نشان می دهد سیلیمارین در بیماران NAFLD موجب کاهش آنزیم های کبدی، بیومارکرهای سرم و بهبود نتایج سونوگرافی شده است (۱۳-۱۵).

بنابراین با وجود مطالعات گسترده در رابطه با نقش بهبود دهندگی سیلیمارین (۱۵) و تمرینات ورزشی (۱۶-۱۸) بر کبد چرب غیر الکلی، این پرسش مطرح می گردد که آیا تمرینات هوازی به همراه مصرف مکمل سیلیمارین می توانند در بهبود کبد چرب موجب هم افزایی شده و اثربخشی این مداخلات را تقویت نماید. در خصوص اثرات توأم تمرینات ورزشی و مصرف سیلیمارین بر عملکرد کبد و ویژگی های بافتی آن مطالعات بسیار محدود است. بر اساس جستجوی ما تنها در یک مطالعه نشان داده شده است که ۸ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط در تعامل با مصرف مکمل سیلیمارین موجب بهبود شاخص گلاسیمیک و آنزیم های کبدی

وزن بدن روزانه به مدت ۸ هفته گاوژا شد (۲۱).

پروتکل تمرین:

حیوانات گروه‌های تمرین پس از یک هفته آشنایی با نوار گردان (سه جلسه در هفته، هر جلسه ۱۰ دقیقه) پروتکل‌های تمرین هوازی تناوبی با شدت بالا و تداومی را شروع کردند. گروه‌های تمرین تناوبی با شدت بالا، ۶ وهله‌ی ۳ دقیقه‌ای دویدن با سرعت ۴۰ متر در دقیقه و استراحت فعال سه دقیقه‌ای با سرعت ۲۰ متر در دقیقه بین وهله‌ها را با شیب ۱۵ درجه انجام دادند. در این پروتکل، سرعت، شیب و مدت فعالیت به صورت تدریجی افزایش پیدا کرد. سرعت اولیه با ۱۵ متر در دقیقه شروع، و در هر جلسه ۱-۲ متر در دقیقه بر اساس توانایی موش‌ها به سرعت نوارگردان اضافه شد. در انتهای هفته‌ی پنجم سرعت به ۴۰ متر در دقیقه رسید و تا پایان دوره تمرینی شدت ثابت باقی ماند. سرعت نوار گردان در ریکاوری فعال نیز با سرعت ۱۲ متر در دقیقه شروع و هر هفته ۱-۲ متر در دقیقه به سرعت نوارگردان اضافه شد. تمرینات به مدت ۸ هفته و تواتر آن ۵ جلسه در هفته بود. تمرین تداومی با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه و شیب ۱۵ درجه بود که از نظر مسافت طی شده با

سانتی‌متر با درب توری نگهداری شدند. حیوانات بعد از یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه به طور تصادفی ابتدا به ۲ گروه سالم (کنترل سالم، ۷ سر) و در معرض دگزامتازون (۴۲ سر) تقسیم شدند. موش‌های در معرض دگزامتازون سپس به ۶ گروه مختلف (۷ سر در هر گروه) تقسیم شدند: ۱- کنترل بیمار ۲- سیلیمارین ۳- تمرین تناوبی ۴- تمرین تناوبی + سیلیمارین ۵- تمرین تداومی ۶- تمرین تداومی + سیلیمارین.

القاء کبد چرب و آماده سازی و مصرف سیلیمارین:

در تمامی گروه‌ها به غیر از گروه کنترل سالم القاء کبد چرب توسط تزریق زیرپوستی دگزامتازون (DEX^۱) (شرکت دارویی داروپخش، ایران)، به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۶ روز در موش‌های صحرائی انجام شد (۲۰). ابتدا پروتکل القاء در یک مطالعه مقدماتی روی ۳ سر موش اجرا گردید. پس از اخذ تاییدات بافت شناسی و آنزیمی از این روش استفاده شد. سیلیمارین (باریج اسانس، کاشان ایران) محلول در سرم فیزیولوژی به گروه‌های مصرف کننده به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از

سنجی آزمایشی اندازه‌گیری شد. بعد از حداقل یک هفته نمونه‌های کبد پارافینه شده و مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. مقاطع تهیه شده توسط روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی شدند. در نهایت لام‌های تهیه شده برای ارزیابی تغییرات بافت شناختی (وجود قطرات چربی در هیپاتوسیت-ها، وجود سلولهای التهابی، گشادی سینوزوئیدهای بین سلولی، هموراژ و آسیب سلولی)

با میکروسکوپ نوری (زایس، آلمان) با بزرگ نمایی ۴۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد ارائه شده است. از آزمون t مستقل جهت مقایسه بین دو گروه کنترل سالم و بیمار استفاده شد. همچنین از آزمون تحلیل واریانس دو سویه جهت بررسی اثرات مجزا و تعاملی تمرین ورزشی و مصرف سیلیمارین در گروههای در معرض دگزامتازون استفاده شد. $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده مقادیر آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم بالاتر

تمرین تناوبی با شدت بالا برابر بود. مدت‌زمان فعالیت از ۱۲ دقیقه در هفته‌ی اول شروع و به ۵۴ دقیقه در هفته‌های آخر رسید (۲۲). هر جلسه شامل ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بدون شیب بود.

خون‌گیری و نمونه برداری بافتی:

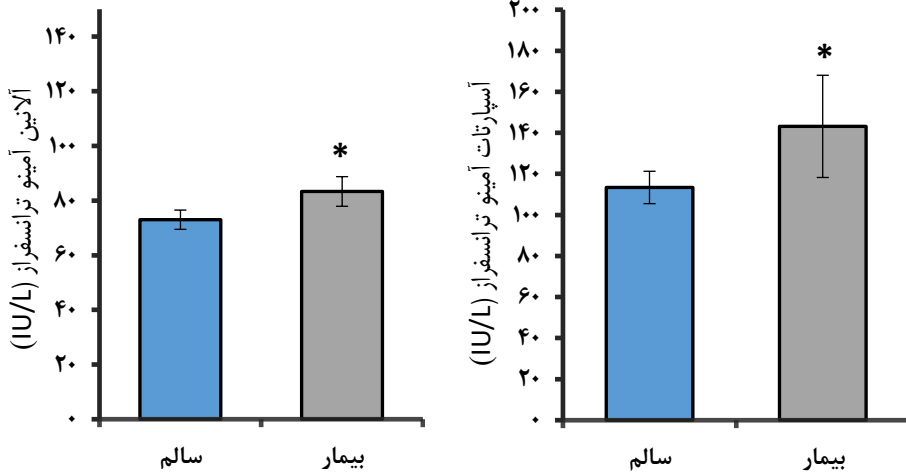
در پایان دوره، به منظور از بین بردن اثر حاد تمرین، نمونه‌گیری‌ها ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی و پس از ناشتایی شبانه انجام شد. پس از بی‌هوش کردن حیوانات با تزریق درون صفاقی ترکیبی از زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و کتامین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن)، خون از قلب گرفته و به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۲۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سرم به دست آمده برای انجام مراحل بعدی تحقیق در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین کبد نیز برداشته توزین و سپس بخشی از لوب میانی به منظور ارزیابی بافت شناسی در محلول فرمالین ۱۰ درصد به منظور تثبیت بافتی قرار داده شد.

اندازه‌گیری متغیرهای پژوهش:

سطوح سرمی آنزیم‌های AST و ALT توسط کیت‌های تجاری (شرکت پارس آزمون) طبق دستورالعمل توضیح داده شده و به روش رنگ

گروه کنترل سالم بطور معناداری بالاتر بود
($t=-۲/۵۴$ ، $p=۰/۰۳$).

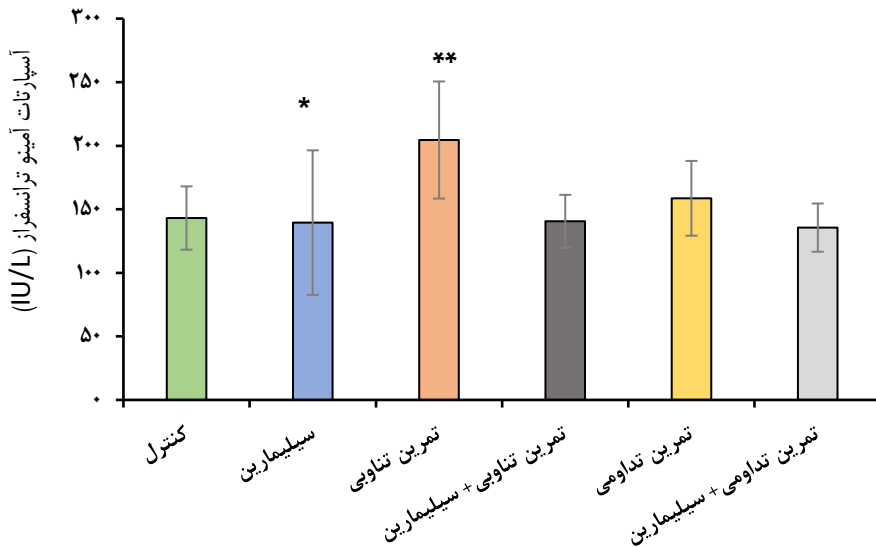
می‌باشد. آزمون t مستقل نیز نشان داد این تفاوت به لحاظ آماری معنادار است
($t=-۳/۶۴$ ، $p=۰/۰۰۵$). آنزیم آسپاراتات آمینو ترانسفراز نیز در گروه کنترل بیمار نسبت به



شکل ۱. مقادیر سرمی دو آنزیم ASP و ALT در دو گروه کنترل سالم و کنترل بیمار
*تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل ($p \leq ۰/۰۵$)

که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد سطوح آنزیم آسپاراتات آمینو ترانسفراز در گروه تمرین تناوبی نسبت به گروه کنترل بطور معناداری بالاتر بود ($p=۰/۰۰۲$). مقدار این آنزیم در گروه تمرین تناوبی+سیلیمارین نیز نسبت به گروه تمرین تناوبی بطور معناداری کاهش یافته بود ($p=۰/۰۰۱$).

نتایج آزمون تحلیل واریانس دو سویه نشان داد اثر تعاملی مصرف مکمل سیلیمارین و تمرین بر سطوح آنزیم کبدی AST معنادار نمی‌باشد ($f=۲/۶۵$ ، $p=۰/۰۸$). لیکن مصرف مکمل سیلیمارین موجب کاهش معنادار سطوح آنزیم کبدی AST شده است. همچنین همانگونه ($f=-۷/۲۶$ ، $p=۰/۰۰۹$).

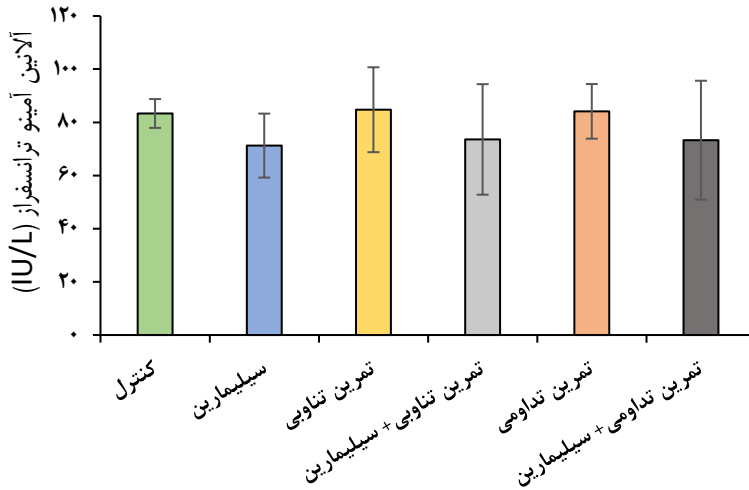


شکل ۲. مقادیر سرمی آنزیم AST در گروه‌های در معرض دگزامتازون *تفاوت معنادار با گروه کنترل ($p \leq 0.05$)، ** تفاوت معنادار با گروه تمرین تناوبی + سیلیمارین ($p \leq 0.05$)

سینوزوئیدهای بین سلولی، هموراژ و آسیب سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی مقاطع بافتی کبد در گروه کنترل سالم حاکی از ساختار طبیعی و حاشیه کاملاً مشخص هپاتوسیت‌ها می‌باشد و هسته‌ها به وضوح قابل مشاهده بودند. علاوه بر این، سلول‌های کبدی نظم و انسجام طبیعی داشته و فاقد هرگونه تجمع چربی در هپاتوسیت‌ها بودند (شکل ۳. قسمت A).

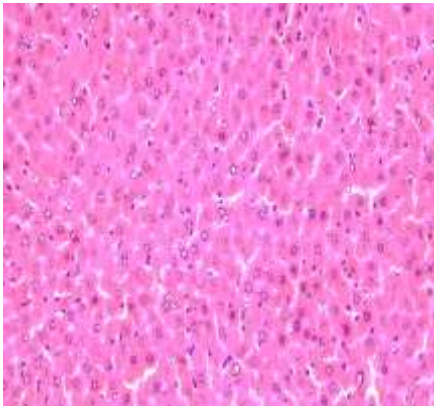
مقادیر سرمی آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو سویه نشان داد اثر تعاملی مصرف مکمل سیلیمارین و تمرین بر سطوح آنزیم کبدی ALT معنادار نمی‌باشد ($p = 0.09$)، مصرف مکمل سیلیمارین موجب کاهش مسطح آنزیم کبدی ALT شده است ($f = 6.36$, $p = 0.017$).

در این مطالعه وجود قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها، سلولهای التهابی، گشادی

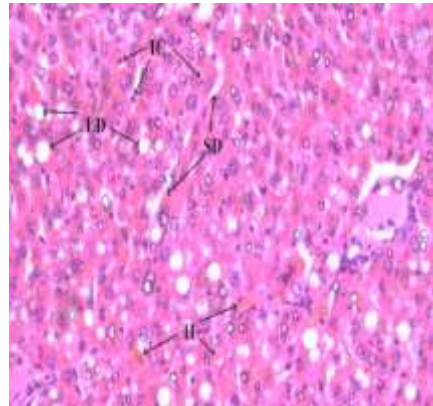


شکل ۳. مقادیر سرمی آنزیم ALT در گروه‌های در معرض دگزامتازون

A: کنترل سالم



B: کنترل بیمار



شکل ۴. مقطع بافت شناسی کبد موش صحرایی در دو گروه کنترل سالم و کنترل بیمار (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) بزرگنمایی ۴۰). IC: سلوهای التهابی، SD: گشادی سینوزوئید، LD: قطرات لیپیدی، H: پرخونی.

قطرات لیپیدی به وفور دیده می‌شود که نشان از تجمع لیپیدها در بافت کبد دارد. علاوه براین تخریب سلولی، هسته‌های آسیب دیده

درحالی که در گروه کنترل بیمار اثرات بی نظمی و از هم گسیختگی سلولی به میزان قابل توجهی در بافت کبد درمقایسه با گروه کنترل سالم افزایش یافته است. همچنین

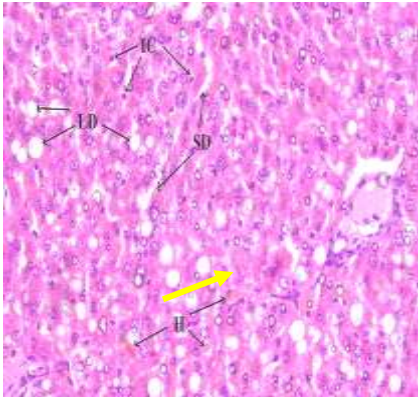
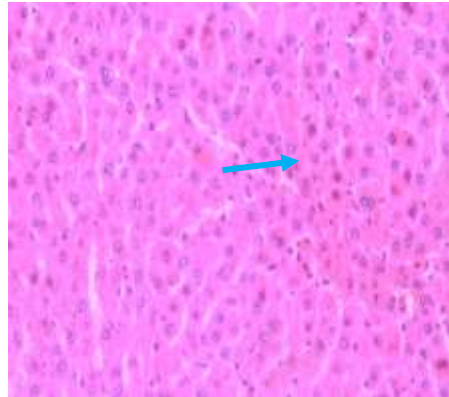
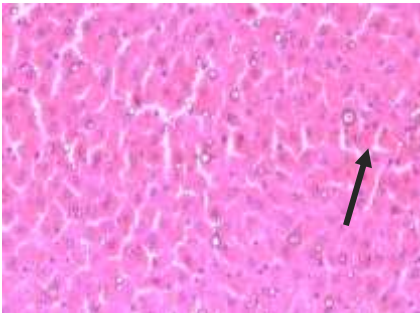
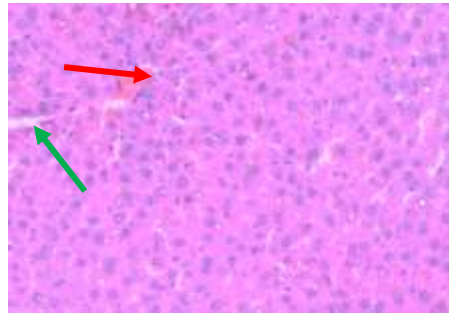
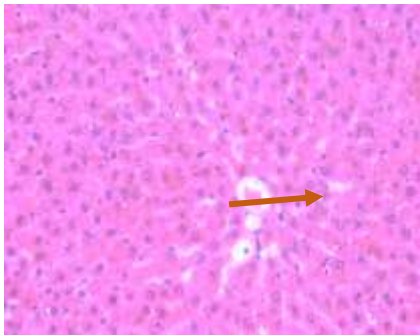
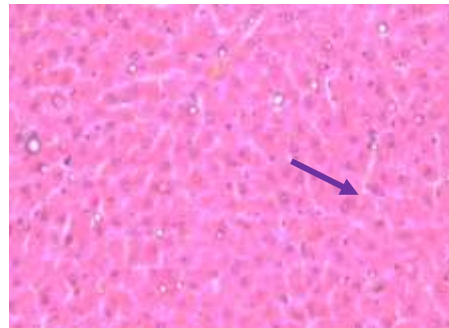
و سلول‌های التهابی در بافت کبد این گروه مشاهده شد. همچنین پرخونی همراه با پراکندگی سلول‌های خونی، پخش شدگی خون و التهاب قابل رویت هستند (شکل ۴. قسمت B). در مقاطع گروه‌های دریافت کننده دگزامتازون با مداخله هر دو نوع تمرین و سیلیمارین درجات کاهش تراکم قطرات لیپیدی، سلول‌های التهابی، لیز سلولی، آسیب هسته، پرخونی دیده شد که گواه بر روند رو به بهبود آسیب بافتی حاصل از دگزامتازون با این مداخلات دارد. ساختار طبیعی بافتی در اغلب نواحی وجود داشت و سلول‌های کبدی با ساختار طبیعی همراه با هسته روشن و سیتوپلاسم منظم قابل مشاهده بودند. باین حال، در بعضی نواحی، از هم گسیختگی و میزان فواصل بین سلولی و جداسازی بافتی رؤیت می‌شود.

نتایج نشان داد در نمونه های گروه تمرین تناوبی میزان پرخونی همراه با پراکندگی سلول‌های خونی و پخش شدگی خون در مقایسه با دیگر گروه‌ها بیشتر مشاهده شد. در نمونه‌های گروه تمرین تداومی نیز بر میزان فواصل بین سلولی افزوده و از هم گسیختگی در سیتوپلاسم سلول در برخی نواحی رؤیت شد (شکل ۴. قسمت C-G)..

تفکیک و درجه بندی تغییرات پدیدآمده در متغیرهای ارزیابی شده بافت کبد در گروه‌های مختلف در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. شدت تغییرات کمی شده از صفر تا ۳ (درجه صفر، عدم تغییر؛ درجه ۱، تغییرات خفیف؛ درجه ۲، تغییرات متوسط و درجه ۳، تغییرات شدید) درجه بندی شدند که شامل تغییرات در شکل ظاهری سلول، شکل هسته و تراکم سینوزوئیدها بودند.

بحث

بیماری کبد چرب غیر الکلی یکی از اختلالات مزمن کبدی است که با افزایش تجمع چربی در بافت کبد شناسایی می‌شود و عمده‌ترین تظاهر بالینی آن افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی یعنی آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح سرمی آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم افزایش داشته است. این نتایج با نتایج دیگر مطالعات موجود همخوانی دارد (۲۴-۲۶).

B: کنترل بیمار**C: سیلیمارین****D: تمرین تناوبی****E: تمرین تناوبی + سیلیمارین****F: تمرین تداومی****G: تمرین تداومی + سیلیمارین**

شکل ۴. مقطع بافت شناسی کبد موش صحرائی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگنمایی ۴۰). B. گروه کنترل بیمار، C. گروه سیلیمارین، D. گروه تمرین تناوبی، E. گروه تمرین تناوبی + سیلیمارین، F. گروه تمرین تداومی، G. گروه تمرین تداومی + سیلیمارین. فلش قرمز: پرخونی، فلش نارنجی: ورید مرکزی، فلش سبز: طناب کبدی و سینوزوئید، فلش بنفش: هسته هپاتوسیت، فلش سیاه: سلول آسیب دیده، فلش زرد: قطرات لیپید، فلش آبی: سلول التهابی.

جدول ۱. تفکیک و درجه بندی تغییرات پدید آمده در متغیرهای ارزیابی شده بافت کبد

گروه	پرخونی	سلول التهابی	سینوزوئید	آسیب سلولی	هسته آسیب دیده	قطرات چربی
کنترل سالم	۰	۱	۱	۰	۰	۰
کنترل بیمار	۳	۳	۳	۳	۳	۳
تمرین تناوبی	۲	۲	۲	۲	۱	۰
تمرین تناوبی+ سیلیمارین	۱	۱	۲	۱	۱	۰
تمرین تداومی	۱	۲	۳	۱	۱	۰
تمرین تداومی+ سیلیمارین	۱	۲	۱	۱	۱	۰
سیلیمارین	۱	۲	۲	۱	۱	۰

توضیح: تغییرات مشاهده شده از عدد صفر تا ۳ درجه بندی شده است. درجه صفر بیانگر عدم تغییر، درجه ۱ بیانگر تغییرات خفیف، درجه ۲ بیانگر تغییرات متوسط و درجه ۳ بیانگر تغییرات شدید می باشد.

آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز هستند. شواهد حاصل از مطالعات نشان داده است که دگزامتازون به عنوان القا کننده استرس اکسیداتیو، می تواند منجر به اختلال عملکرد میتوکندری شود (۲۶). در واقع تجمع بیش از حد ROS ممکن است هموستاز سلولی را مختل کرده و منجر به آسیب و مرگ سلولی شود (۲۷). رادیکال های آزاد عمدتاً از طریق تغییر در عملکرد مسیرهای سیگنالیینگ و واکنش با لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین ها سبب تغییر در عملکرد و ساختار سلولها و اندامها می شوند. از طرفی ROS می تواند با فعال کردن سیتوکاین های پیش التهابی سبب فعال شدن پاسخ های التهابی و بدتر شدن وضعیت آسیب در بافت در معرض

در این مطالعات نیز افزایش چشمگیری در سطح سرمی ALT، AST و آلکالین فسفاتاز (ALP)^۱ پس از تزریق دگزامتازون نشان داده شده است. نتایج بافت شناسی پژوهش حاضر نیز نشان داد که در گروه کنترل بیمار، بی نظمی و از هم گسیختگی به میزان قابل توجهی در بافت افزایش یافته است. تجمع بیش از حد چربی در کبد به شکل قطرات لیپیدی به فراوانی در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده می شود. همچنین میزان زیادی پرخونی به همراه پراکندگی سلول های خونی در فضای بین بافتی دیده می شود. مطالعات نشان داده اند که عمده ترین مکانیسم های آسیب رسان که تحت مسمومیت دارویی از جمله دگزامتازون فعال می شوند التهاب،

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که تمرین تداومی بر سطوح آنزیم ALT و AST اثری نداشته است. همسو با این نتایج مطالعات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد سطوح این آنزیم‌ها با تمرین تغییری نکرده است (۳۳). در مطالعه حاضر مقاطع بافتی گروه تمرین هوازی کاهش تراکم قطرات لیپیدی، تعداد سلول‌های التهابی و آسیب هسته سلول و کاهش پر خونی مشاهده می‌شود که گواهِ بر روند رو به بهبود آسیب بافتی حاصل از دگزامتازون در پاسخ به این مداخله می‌باشد. در این راستا هالس-ورث و همکاران^۲ نیز نشان دادند در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی میزان چربی کبد پس از ۸ هفته تمرین مقاومتی بطور معناداری کاهش داشته است در حالی که آنزیم‌های کبدی تغییر نکرده بودند (۱۸). بنابراین به این نکته نیز باید توجه داشت که سطح این دو آنزیم می‌تواند در غیاب چربی اضافی درون کبدی، بالا و بر عکس با وجود حضور چربی کبد در محدوده طبیعی باشند (۳۴-۳۶) لذا سطوح پلاسمایی آمینوترانسفرازها شاخص ضعیفی برای نمایش چربی درون کبدی می‌باشد.

گلوکوکورتیکوئید شوند. با ادامه این چرخه معیوب و عدم مهار آن اسبب بافتی به شدت افزایش یافته و می‌تواند در مواردی به نارسایی بافتی نیز ختم شود.

در تحقیق حاضر میزان آنزیم‌های کبدی با سیلیمارین کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل بیمار نشان داد. ژو و همکاران^۱ نیز نشان دادند سطح ALT و AST در موشهای مقاوم به انسولین و دچار تخریب کبدی، با مصرف سیلیمارین بطور معناداری کاهش یافته است (۲۸). سیلیمارین بعنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند از طریق کاهش میزان رادیکال‌های آزاد مانند هیدروکسیل، سوپراکسید و پراکسید هیدروژن و افزایش تحریک تولید گلوکوتایون و تحریک فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز باعث جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و حفظ یکپارچگی غشا سلول شده و از خارج شدن آنزیم‌های داخل سلولی ممانعت بعمل آورده و در نتیجه باعث کاهش آسیب به بافت کبد گردد (۲۹،۳۰). ضمن این که سیلیمارین با مهار ژن NF-κB و به دنبال آن کاهش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی از کبد در برابر آسیب محافظت می‌کند (۲۸، ۳۱، ۳۲).

منشاء عضلانی داشته است. به عبارتی احتمالاً تمرین شدید آسیب بافت عضلانی را در این گروه تشدید نموده است. البته از محدودیت‌های این پژوهش عدم اندازه‌گیری آنزیم کراتین کیناز است که می‌توانست فرضیه مطرح شده را تقویت نماید. نکته دیگر آن که نشان داده شده است فعالیت شدید عضلانی موجب افزایش ترانس آمینازها و دیگر آنزیم‌های عملکرد کبدی شده و سطوح آنها حتی تا ۷ روز پس از تمرین بالاتر از سطوح پایه باقی می‌ماند (۴۳). بنابراین این احتمال وجود دارد بالا بودن شدت تمرین در گروه تمرین تناوبی نسبت به تمرین تداومی موجب افزایش سطوح AST شده باشد.

نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد مصرف مکمل سیلیمارین و تمرین هوازی (تداومی و تناوبی) بصورت مجزا و در ترکیب با یکدیگر می‌تواند موجب بهبود وضعیت بافت کبد موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب غیر الکلی القاء شده با دگزامتازون باشد.

تشکر

بدین وسیله از تمامی افرادی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

پژوهش‌های موجود نشان می‌دهد تمرینات تناوبی هوازی با شدت بالا اثرات مطلوبی بر بهبود علائم بیماری کبد چرب غیر الکلی داشته است (۳۷-۴۱). HIIT از طریق مکانیسم‌های متعددی از جمله افزایش فعالیت آنزیم سیترات سنتاز و اکسیداسیون چربی، افزایش $PPAR\alpha$ (۳۷)، افزایش بیان ژن گلوکوتاتیون پروکسیداز و $PPAR\gamma$ کبدی (۳۸) موجب افزایش عملکرد میتوکندری کبد و در نتیجه بهبود استئاتوز کبدی شده است. نتایج کیفی حاصل از بررسی بافت شناختی مطالعه حاضر نیز نشان داد تعداد سلول التهابی، آسیب دیده و قطرات چربی در گروه تمرین تناوبی و تمرین تناوبی + سیلیمارین در مقایسه با کنترل بهبود یافته است. اما سطوح سرمی آنزیم AST در گروه تمرین تناوبی در مقایسه با گروه کنترل بیمار بالاتر بود. در توضیح چنین نتیجه متناقضی (بهبود ویژگی بافت شناختی و افزایش سطوح سرمی AST) شاید این نکته را باید در نظر داشت که تزریق دگزامتازون موجب ایجاد آتروفی و آسیب عضلانی می‌شود که نتیجه آن می‌تواند افزایش سطوح در گردش AST و ALT باشد (۴۲). بنابراین شاید افزایش سطوح سرمی آنزیم مذکور در گروه تمرین با شدت بالا،

حامی مالی

این مقاله بر گرفته از رساله دکتری فاطمه مختاری اندانی، دانشکده تربیت بدنی و علوم

ورزشی دانشگاه مازندران می باشد. همچنین

مقاله حاضر توسط بنیاد ملی علم ایران^۱ به شماره پرونده ۹۹۰۱۴۶۹۷ حمایت مالی شد.

منابع

1. Musso G ,Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in lipid research*. 2009;48(1):1-26.
2. Demir M, Lang S, Steffen HM. Nonalcoholic fatty liver disease—current status and future directions. *Journal of digestive diseases*. 2015;16(10):541-57.
3. Ahmed MB, Hasona NA-S, Selemain HA-H. Protective effects of extract from dates (*Phoenix dactylifera* L.) and ascorbic acid on thioacetamide-induced hepatotoxicity in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2008; 7(3): 193-201.
4. Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: interplay between diet, gut microbiota, and genetic background. *Gastroenterology research and practice*. 2016.; 2016:2862173.
5. Sullivan S, Kirk EP, Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55(6):1738-45.
6. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, et al. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 2009; 50:1105–12.
7. Cassidy S, Thoma C, Houghton D, et al. High-intensity interval training: a review of its impact on glucose control and cardiometabolic health. *Diabetologia* 2017;60:7–23.
8. Abdelbasset WK, Tantawy SA, Kamel DM, et al. A randomized controlled trial on the effectiveness of 8-week high-intensity interval exercise on intrahepatic triglycerides, visceral lipids, and health-related quality of life in diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine* 2018;98:e14918.
9. Sahin E, Bagci R, Bektur Aykanat NE, Kacar S, and Sahinturk V. Silymarin attenuated nonalcoholic fatty liver disease through the regulation of endoplasmic reticulum stress proteins GRP78 and XBP-1 in mice. *Journal of food biochemistry*. 2020; 44(6):e13194.
10. Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.). *Integrative cancer therapies*. 2007;6(2):146-57.
11. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(3):803-6.
12. Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, Sapp J, Lawrence VA. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of medicine*. 2002;113(6):506-15.

13. Federico A, Dallio M, Masarone M, Gravina AG, Di Sarno R, Tuccillo C, Cossiga V, Lama S, Stiuso P, Morisco F, Persico M, Loguercio C. Evaluation of the Effect Derived from Silybin with Vitamin D and Vitamin E Administration on Clinical, Metabolic, Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress Parameters, and Serological Worsening Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;8742075.
14. Zhong, S.; Fan, Y. The therapeutic effect of silymarin in the treatment of nonalcoholic fatty disease A meta-analysis (PRISMA) of randomized control trials. *Medicine* 2017, 96, e9061.
15. Curcio A, Romano A, Cuozzo S, et al. Silymarin in Combination with Vitamin C, Vitamin E, Coenzyme Q10 and Selenomethionine to Improve Liver Enzymes and Blood Lipid Profile in NAFLD Patients. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(10):544.
16. Guo R, Liong EC, So KF, Fung M-L, Tipoe GL. Beneficial mechanisms of aerobic exercise on hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2015;14(2):139-44.
17. Suzuki A, Lindor K, St Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, et al. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2005; 43(6):1060-6.
18. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut*. 2011;60(9):1278-83.
19. Ghalandari K, Shabani M, Khajehlandi A, Mohammadi A. Effect of aerobic training with silymarin consumption on glycemic indices and liver enzymes in men with type 2 diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2020;1-6.
20. Safaeian L, Zolfaghari B, Karimi S, Talebi A, Ghazvini MA. The effects of hydroalcoholic extract of *Allium elburzense* Wendelbo bulb on dexamethasone-induced dyslipidemia, hyperglycemia, and oxidative stress in rats. *Research in pharmaceutical sciences*. 2018;13(1):22.
21. Prakash P, Singh V, Jain M, Rana M, Khanna V, Barthwal MK, et al. Silymarin ameliorates fructose induced insulin resistance syndrome by reducing de novo hepatic lipogenesis in the rat. *European journal of pharmacology*. 2014; 727:15-28
22. Kolahdouzi S, Talebi-Garakani E, Hamidian G, Safarzade A. Exercise training prevents high-fat diet-induced adipose tissue remodeling by promoting capillary density and macrophage polarization. *Life sciences*. 2019;220:32-43 .
23. Jackson ER, Kilroy C, Joslin DL, Schomaker SJ, Pruiimboom-Brees I, Amacher DE. The early effects of short-term dexamethasone administration on hepatic and serum alanine aminotransferase in the rat. *Drug and chemical toxicology*. 2008;31(4):427-45.
24. Nkono B, Sokeng SD, Désiré DDP, Kamtchouing P. Antihyperglycemic and antioxydant properties of *alstonia boonei* De wild.(Apocynaceae) stem bark aqueous extract in dexamethasone-induced hyperglycemic rats .*Int J Diabetes Res*. 2014;3(3):27-35.

25. Tovchiga OV. The influence of goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) tincture and metformin on the carbohydrate and lipid metabolism in dexamethasone-treated rats. *BMC complementary and alternative medicine* 2016; 16, 235.
26. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein RS, Manolagas SC. Glucocorticoids and tumor necrosis factor α increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(52):44326-35.
27. Zhen Yf, Wang Gd, Zhu Lq, Tan Sp, Zhang Fy, Zhou Xz, et al. P53 dependent mitochondrial permeability transition pore opening is required for dexamethasone-induced death of osteoblasts. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(10):1475-83.
28. Guo, Y., Wang, S., Wang, Y., & Zhu, T. (2016). Silymarin improved diet-induced liver damage and insulin resistance by decreasing inflammation in mice. *Pharmaceutical biology*, 54(12), 2995–3000.
29. Shelbaya L. Evaluation of protective and antioxidant activity of milk thistle on paracetamol-induced toxicity in rats .*The Journal of American Science*. 2013;9(10):272-8.
30. Pradhan S, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian journal of medical research*. 2006;124 (5): 491-504
31. Mahjoor A, Dehghan A. Effect of silymarin on metabolic factors of food-restricted over conditioned Wistar rats. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2008;11(14):1835-9.
32. Zhang W, Hong R, Tian T. Silymarin's protective effects and possible mechanisms on alcoholic fatty liver for rats. *Biomolecules & therapeutics*. 2013;21(4):264.
33. Rodriguez B, Torres DM, Harrison SA. Physical activity: an essential component of lifestyle modification in NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012; 9(12):726-31.
34. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E462e8.
35. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008; 48:792e8.
36. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37:1286e92.
37. Linden, M.A.; Fletcher, J.A.; Morris, E.M.; Meers, G.M.; Laughlin, M.H.; Booth, F.W.; Sowers, J.R.; Ibdah, J.A.; Thyfault, J.P.; Rector, R.S. Treating NAFLD in OLETF rats with vigorous-intensity interval exercise training. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2015, 47, 556–567.
38. Kapravelou, G.; Martínez, R.; Andrade, A.M.; Nebot, E.; Camiletti-Moirón, D.; Aparicio, V.A.; Lopez-Jurado, M.; Aranda, P.; Arrebola, F.; Fernandez-Segura, E.; et al. Aerobic interval exercise improves parameters of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations of metabolic syndrome in obese Zucker rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2015, 40, 1242–1252.

39. Marcinko, K.; Sikkema, S.R.; Samaan, M.C.; Kemp, B.E.; Fullerton, M.D.; Steinberg, G.R. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. *Mol. Metab.* 2015, 4, 903–915.
40. Kalaki-Jouybari, F.; Shanaki, M.; Delfan, M.; Gorgani-Firouzjae, S.; Khakdan, S. High-intensity interval training (HIIT) alleviated NAFLD feature via miR-122 induction in liver of high-fat high-fructose diet induced diabetic rats. *Archives of physiology and biochemistry.* 2020, 126(3), 242–249.
41. Cho J, Kim S, Lee S, Kang H. Effect of Training Intensity on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicine and science in sports and exercise.* 2015; 47(8):1624-1634.
42. Nicastro H, Zanchi NE, da Luz CR, et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. *Nutrition.* 2012; 28(4):465-471.
43. Pettersson J, Hindorf U, Persson P, et al. Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65(2):253-259.



Effect of silymarin supplementation and continuous and high intensity interval training on liver enzymes and histological modifications in rats with dexamethasone-induced nonalcoholic fatty liver disease

Mokhtari F¹, Talebi- Garakani E^{2*}, Nasiri kh³, Akbari A⁴

Received: 16/3/2022

Accepted: 22/5/2022

Published: 22/11/2022

Abstract

Aim: The purpose of this study was to evaluate the effect of continuous and high intensity interval training with silymarin consumption on liver enzymes and histological modifications in rats with dexamethasone-induced nonalcoholic fatty liver disease.

Method: Male rats (229.71 ± 18.94 g) were initially divided into 2 groups: normal (n=7) and exposed to dexamethasone (n=42). For induction of fatty liver, $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ dexamethasone was injected subcutaneously for 6 days. Dexamethasone group were then randomly divided into 6 groups, As follows: control (C), Silymarin (S), continues training (CT), and continues training + silymarin (CTS), high intensity interval training (HIT), high intensity interval training + Silymarin (HITS). Silymarin groups, received $300 \text{ mg. kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ of silymarin solution through gavage. Animals in high intensity interval training groups performed 3-min bouts at 40 m/min, interspersed by 3-min active recovery at a running velocity of 20 m/min on a motorized treadmill with 15% incline, repeated six times per session. Continues training groups performed steady state running at the same speed as the active recovery's speed in the HIT group. Liver histological examination was performed using haematoxylin and eosin staining of sections, and serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate transaminase (AST) were assayed using enzymatic colorimetric methods. Findings were analyzed by two-way analysis of variance test.

Results: Liver histological findings of the dexamethasone group indicated hepatic steatosis compared with normal group. However, silymarin consumption and aerobic training were able to improve histological changes compared with control group. The results indicated that the interactive effect of silymarin supplementation and training on serum AST and ALT levels was not significant. However, silymarin supplementation significantly reduced liver AST ($p=0.009$) and ALT ($p=0.017$) enzyme levels. Also, AST levels were significantly higher in HIT group than in the control group ($p=0.002$). The amount of this enzyme in the HITS was also significantly reduced compared to the HIT group ($p=0.001$).

Conclusion: Silymarin supplementation and aerobic training (continuous and intermittent) separately and in combination may improve liver histological status of rats with dexamethasone-induced nonalcoholic fatty liver. It seems combination of training and silymarin has a greater benefits on liver tissue.

Keywords: High Intensity Interval Training, Continuous Training, Silymarin, Aspartate Aminotransferase, Alanine Aminotransferase, Histology

1. PhD student in Exercise Physiology, 2. Associate Professor, University of Mazandaran, 3. Assistant Professor, University of Mazandaran, 4. PhD in Exercise Physiology.

*Email: e.talebi@umz.ac.ir