

## Effect of resveratrol supplementation and interval exercise on heart cells apoptosis in male rats with non-alcoholic fatty liver

**Hossein Mahdian (M.Sc)**, Ph.D Candidate in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7444-5166

**\*Parvin Farzanegi (Ph.D)**, Corresponding Author, Associated Professor in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran. E-mail: [parvin.farzanegi@gmail.com](mailto:parvin.farzanegi@gmail.com) ORCID ID: 0000-0003-2182-3068

**Amin Farzaneh Hesari (Ph.D)**, Assistant Professor in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3477-8286

---

### Abstract

**Background and Objective:** Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic hepatic diseases which may be associated with cardiovascular disease. This study aimed to consider the effect of combined therapy with resveratrol supplementation and interval exercise training on heart cells apoptosis in rats with NAFLD using TUNEL assay.

**Methods:** This experimental study was done on 35 Wistar rats. Animals were randomly allocated into five groups including control (healthy) and four NAFLD groups, including patient, resveratrol, interval exercise, and resveratrol + interval exercise. A TUNEL assay kit was applied for the detection of apoptosis in heart tissue.

**Results:** The patient group had significantly higher percentage of heart apoptotic cells ( $24.38 \pm 0.69\%$ ) compared to the other groups ( $P < 0.05$ ), while the resveratrol + interval exercise ( $9.02 \pm 0.49\%$ ) and resveratrol ( $9.47 \pm 0.83\%$ ) groups showed significantly lower mean levels of heart apoptotic cells compared to the patient and interval exercise ( $P < 0.05$ ) groups. There was no significant difference in mean of apoptotic cells between resveratrol and resveratrol + interval exercise groups. The mean of apoptotic cells in interval exercise group was  $11.39 \pm 0.28\%$ .

**Conclusion:** Nonalcoholic fatty liver disease is considerably associated with heart cells apoptosis. Resveratrol supplementation especially combined with interval exercise significantly reduces apoptotic cells in heart tissue.

**Keywords:** Non-alcoholic fatty liver, Heart, Apoptosis, Interval training, Resveratrol, TUNEL assay

---

Received 30 Dec 2018

Revised 16 Feb 2019

Accepted 18 Feb 2019

Cite this article as: Hossein Mahdian, Parvin Farzanegi, Amin Farzaneh Hesari. [Effect of resveratrol supplementation and interval exercise on heart cells apoptosis in male rats with non-alcoholic fatty liver]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Winter; 21(4): 39-46. [Article in Persian]

## اثر درمان ترکیبی مکمل رزوراترول و ورزش تناوبی بر میزان آپوپتوز سلول‌های بافت قلبی موش‌های صحرائی نر دچار کبد چرب غیرالکلی

ORCID ID: 0000-0001-7444-5166

حسین مهدیان، دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

ORCID ID: 0000-0003-2182-3068

\* دکتر پروین فرزانی، دانشیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

ORCID ID: 0000-0003-3477-8286

دکتر امین فرزانه حصاری، استادیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری کبد چرب غیرالکلی (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) یکی از مهم‌ترین اختلالات مزمن کبدی است که احتمالاً با مشکلات قلبی نیز مرتبط است. این مطالعه به منظور تعیین اثر درمان ترکیبی مکمل رزوراترول و ورزش تناوبی بر میزان آپوپتوز سلول‌های بافت قلبی موش‌های صحرائی نر دچار کبد چرب غیرالکلی به روش نائل انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی روی ۳۵ سر موش صحرائی نر از نژاد ویستار انجام شد. حیوانات به ۵ گروه ۷ تایی شامل گروه کنترل (سالم) و چهار گروه NAFLD شامل گروه بیمار، گروه دریافت‌کننده رزوراترول، گروه ورزش تناوبی و گروه رزوراترول توأم با ورزش تناوبی تقسیم شدند. میزان آپوپتوز سلول‌های بافت قلبی به روش TUNEL بررسی گردید.

**یافته‌ها:** گروه بیمار به‌طور معنی‌داری دارای بیشترین میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده قلبی ( $24/38 \pm 0/69$  درصد) در مقایسه با سایر گروه‌ها بود ( $P < 0/05$ ). در حالی که گروه‌های ترکیبی رزوراترول + ورزش تناوبی ( $9/02 \pm 0/49$  درصد) و مکمل رزوراترول ( $9/47 \pm 0/83$  درصد) دارای کمترین میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده قلبی در مقایسه با گروه‌های بیمار و صرفاً ورزش تناوبی بودند ( $P < 0/05$ ). تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه رزوراترول + تمرین ورزشی و مکمل رزوراترول مشاهده نگردید. میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز قلبی در گروه ورزش تناوبی برابر با  $11/39 \pm 0/28$  درصد تعیین شد.

**نتیجه‌گیری:** بیماری کبد چرب غیرالکلی به‌طور چشمگیری با آپوپتوز سلول‌های قلبی همراه است. تجویز مکمل رزوراترول، به‌ویژه همراه با ورزش تناوبی، به‌طور چشمگیری سبب کاهش میزان آپوپتوز سلول‌های بافت قلبی می‌گردد.

**کلید واژه‌ها:** بیماری کبد چرب غیرالکلی، قلب، آپوپتوز، تمرین ورزشی تناوبی، رزوراترول، روش نائل

\* نویسنده مسؤول: دکتر پروین فرزانی، پست الکترونیکی parvin.farzanegi@gmail.com

نشانی: ساری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، گروه فیزیولوژی ورزش، کد پستی: ۴۸۱۶۶۱۳۴۸۵، تلفن ۰۱۱-۳۴۴۴۵۸۱۴

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۷/۸، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹

### مقدمه

بدنی و همچنین چاقی به عنوان مهم‌ترین عوامل خطر برای بروز و پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی محسوب می‌گردند. از طرفی کاهش فعالیت جسمانی توأم با افزایش وزن یا چاقی با اختلالات دیگری از جمله مقاومت به انسولین و دیابت همراه هستند که این سندروم متابولیک به نوبه خود احتمال بروز بیماری کبد چرب غیرالکلی را نیز افزایش داده و افزایش تجمع چربی‌ها از جمله تجمع تری‌گلیسرید در کبد می‌شوند (۳). با توجه به این که شیوه زندگی و سبک تغذیه‌ای در بین جامعه امروزی به شدت در حال تغییر بوده و در پی آن فعالیت جسمانی افراد نیز به شدت در حال کاهش است؛ افزایش چشمگیر در شیوع بیماری کبد چرب در بین جامعه امروزی دور از انتظار نیست.

بیماری NAFLD نه تنها منجر به اثرات مخرب شدیدی بر روی کبد و عملکرد آن می‌شود؛ بلکه با انواعی از بیماری‌های ثانویه به ویژه بیماری‌های قلبی و عروقی نیز مرتبط است (۴). مطالعات اخیر

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) (non-alcoholic fatty liver disease) نوعی سندرم متابولیک است که منجر به ناهنجاری‌های متعددی در بافت کبدی از رسوب یا تجمع چربی‌ها در بافت کبد تا التهاب کبدی ناشی از رسوب چربی (NASH) و سیروز کبدی می‌گردد (۱). از آنجایی که NAFLD با تجمع بیش از حد توده‌های چربی در داخل سلول‌های کبدی همراه است؛ این وضعیت منجر به آسیب شدید سلول‌های کبدی و در نتیجه مرگ سلولی توأم با آسیب‌های جدی بر روی عملکرد بافت کبد و نهایتاً مرگ می‌گردد (۲). عوامل مختلفی از قبیل افزایش سن، سبک زندگی، وضعیت اقتصادی، عادات تغذیه‌ای، سابقه خانوادگی، عوامل ژنتیکی، بیماری‌های متابولیکی نظیر دیابت، استعمال به دخانیات و کاهش فعالیت فیزیکی نقش بسیار مهمی در بروز بیماری کبد چرب غیرالکلی دارند (۳). کاهش فعالیت‌های

بررسی قرار داده اند (۱۱). مطالعات نشان دادند که تغییر رژیم غذایی و فعالیت بدنی با تاثیر بر سوخت و ساز چربی کبدی باعث تعدیل چربی کبدی می‌گردد. از طرفی فعالیت‌های منظم ورزشی با کاهش ذخایر چربی و افزایش سرعت متابولیسم به عنوان یک عامل پیشگیری کننده اساسی در بروز بیماری قلبی و عروقی محسوب می‌گردد. با اینحال، مکانیسم تاثیر فعالیت بدنی به‌طور مستقل و یا در ترکیب با مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در کاهش چربی بیماران مبتلا به NAFLD و همچنین عملکرد و پاتولوژی قلبی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (۱۱). به‌نظر می‌رسد که ورزش منظم سبب کاهش مدیاتورهای التهابی و افزایش ظرفیت یا فعالیت آنتی‌اکسیداتی در بدن می‌گردد. هر چند برخی مطالعات توصیفی نشان داده‌اند که ارتباط مثبت و معنی‌داری بین مصرف میوه و سبزیجات سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها و کاهش خطر ابتلا به بیماری NAFLD وجود دارد (۱۲).

مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در کنار ورزش‌های منظم از دیگر عوامل موثر بر روی NAFLD پیشنهاد شده است. یکی از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی رایج در بهبود انواعی از بیماری‌ها، رزوراترول است. رزوراترول نه تنها منجر به افزایش طول عمر می‌گردد؛ بلکه با ایجاد تغییر در تنظیمات چرخه سلولی، آپوپتوز، اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی و مهار آنتی‌اکسیدان‌ها، منجر به مهار پیشرفت سرطان می‌گردد. رزوراترول همچنین متابولیسم لیپیدها را تنظیم می‌کند و جلوی اکسیداسیون لیپیدها و تجمع پلاکت‌ها را می‌گیرد (۱۳). لذا با توجه به تغییرات ناشی از بیماری کبد چرب غیرالکلی و تاثیر آن بر روی عملکرد بافت قلبی، این مطالعه به منظور تعیین اثر درمان ترکیبی مکمل رزوراترول و ورزش تناوبی بر میزان آپوپتوز سلول‌های بافت قلبی موش‌های صحرایی نر دچار کبد چرب غیرالکلی به روش تانل انجام شد.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (سن ۴۰ تا ۵۰ هفته‌ای) با میانگین وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری در سال ۱۳۹۷ انجام شد.

موش‌های مورد مطالعه به تعداد ۵ عدد در هر قفس از جنس پلی‌کربنات (۱۵ × ۱۵ × ۳۰ سانتی‌متر)، در یک شرایط آب و هوایی کنترل شده (دمای ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰±۵ درصد، یک سیکل شب و روز ۱۲:۱۲) و با رژیم غذایی استاندارد و آب مورد نیاز در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری (IR.IAU.SARI.REC.1395.54) قرار گرفت.

**الفاء NAFLD در موش‌ها:** در مرحله اول موش‌ها به صورت

نشان دادند که یک ارتباط دو طرفه قوی بین بیماری کبد چرب و بیماری‌های قلبی و عروقی وجود دارد؛ هر چند مکانیسم دقیق آن به خوبی شناخته نشده است. از آنجایی که بیماری‌های قلبی و عروقی نیز در کنار سندرم متابولیکی کبد چرب به عنوان یکی از دلایل اصلی ناتوانی و مرگ و میر در سراسر جهان محسوب می‌گردند و با توجه به ارتباط تنگاتنگ بین بیماری کبد چرب غیرالکلی و بیماری قلبی و عروقی، بررسی و پیشگیری عوامل خطر مرتبط با بیماری‌های کبد چرب و قلبی و عروقی و همچنین درمان آنها بسیار حائز اهمیت است (۵). در یک مطالعه Wang و همکاران نشان دادند که افزایش سطح آلانین ترانسفراز در بیماران مبتلا به NAFLD با بیماری قلبی - عروقی مرتبط است (۶). تحقیق دیگری نشان داده که ضخامت انتیامدای شریان کاروتید قلبی در گروه بیماران مبتلا به NAFLD در مقایسه با افراد نرمال به‌طور معنی‌داری بیشتر است (۷). این نتایج دال بر افزایش خطر رسوب چربی در دیواره رگ‌ها در این بیماران است که با احتمال حملات قلبی و یا مشکلات قلبی - عروقی نظیر اترواسکلروز همراه است. پژوهش دیگری در یونان نشان داد که کبد چرب غیرالکلی با ایجاد اختلال در سلول‌های اندوتلیوم، باعث افزایش سختی شریانی و افزایش ضخامت انتیامدیا در شریان کاروتید می‌شود (۸). در پژوهش دیگری Caserta و همکاران نشان دادند که افراد مبتلا به NAFLD دارای تغییرات آترواسکلروز بیشتر و افزایش ضخامت انتیامدیا در شریان‌های کاروتید در مقایسه با افراد فاقد کبد چرب هستند (۹). اگرچه این مطالعات ارتباط بین بیماری کبد چرب غیرالکلی و بیماری قلبی و عروقی را نشان دادند؛ مکانیسمی که طی آن بیماری کبد چرب سبب آسیب سلول‌های قلبی و مشکلات قلبی می‌گردد؛ هنوز به خوبی روشن نشده است. با این حال، مطالعات اخیر نشان دادند که استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش سطح رادیکال‌های آزاد (ROS) و همچنین التهاب مزمن که با کاهش غلظت موثر سطح آنتی‌اکسیدان‌ها همراه است؛ به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی گسترش بیماری کبد چرب غیرالکلی محسوب می‌شوند که می‌تواند منجر به آپوپتوز سلول‌های قلبی و همچنین اثرات پاتولوژیک شدید بر روی عملکرد آنها شوند (۱۰). با توجه به فرضیه‌های موجود، به‌نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش سطح ROS و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از مکانیسم‌های احتمالی در آسیب و آپوپتوز سلول‌های قلبی در بیماران مبتلا به NAFLD باشد. بنابراین، پیدا کردن یک استراتژی درمانی مناسب و کم‌هزینه در جهت کاهش آپوپتوز سلولی کمک زیادی در پیشگیری و درمان بیماری خواهد داشت.

امروزه بسیاری از پژوهش‌ها اثر انواع مختلفی از فعالیت ورزشی را بر بهبود عملکرد کبد در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی و همچنین بهبود عملکرد قلبی در بیماران دارای مشکلات قلبی مورد

تهیه نمونه بافت قلبی و بررسی آپوپتوز به روش TUNNEL: پس از تمام دوره تحقیق، 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 میلی گرم بازای هر کیلوگرم) و زایلوزین (۵ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن) با نسبت ۵ به ۲ بیهوش شدند (۱۴). نمونه‌های قلبی جدا و سپس ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. سپس به دو صورت عرضی و طولی برش زده شدند. نمونه قبل از انجام کار، ۲۴ ساعت دیگر در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد. نمونه‌های تهیه شده از بافت، با عبور از مراحل آب گیری (الکل ۱۰۰-۷۰ درصد)، شفاف سازی (گزیلول) و آغستگی در پارافین، طی یک دوره ۱۵ ساعته (هر مرحله به‌طور متوسط ۱/۵ ساعت) آماده قالب گیری شدند. در پایان مرحله پردازش، نمونه‌ها به ظرف پارافین در داخل دستگاه اتو وارد شده و تمام نمونه‌ها به صورت جداگانه با استفاده از پارافین، قالب گیری شدند. میزان آپوپتوز سلول‌های بافت قلبی به روش TUNEL (با کیت اختصاصی (In Situ Cell Death Detection Kit, POD; Roche, Germany) و بر اساس کیت شرکت سازنده مورد بررسی قرار گرفته بود. به‌طور خلاصه، پس از پارافین زدایی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در گزیلول قرار گرفتند. سپس لام‌ها به ترتیب در الکل‌های ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درصد آبدهی شدند. پس از آن، لام‌ها با استفاده از محلول PBS شسته شدند و سپس در پروتیناز k به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در ادامه لام‌های بافتی مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه با محلول نفوذپذیرکننده انکوبه و سپس مجدداً با PBS شستشو داده شدند. در مرحله بعد، محلول رنگ تانل به میزان ۵۰ میکرولیتر روی هر نمونه بافتی ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و پس از شستشوی نهایی با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss LSM 5 fluorescent microscope) مشاهده شدند. برای شمارش سلول‌های مرده ۵ فیلد در هر گروه مورد شمارش قرار گرفتند. سطحی معادل یک میلی متر مربع در هر گروه برای شمارش در نظر گرفته شد. برای رنگ آمیزی نمونه‌های کنترل مثبت از هر دو محلول TUNEL-Enzyme solution و TUNEL-Lable solution به نسبت ۱ به ۹ استفاده شد. در حالی که برای نمونه‌های کنترل منفی تنها از TUNEL lable solution استفاده گردید. سلول‌های آپوپتوز شده در این بافت، نقطه‌های روشن بودند که نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده نشان‌دار شده طی رنگ آمیزی تانل بودند. هسته سلول‌ها با رنگ Propidium iodide (PI) به میزان ۱ mg/ml به عنوان محلول ذخیره که به میزان ۵۰۰ برابر در زمان استفاده رقیق شده بود؛ به صورت قرمز در آمدند و سلول‌های سبز رنگ تانل مثبت پس از ترکیب با رنگ قرمز هسته‌ای به صورت نارنجی در آمدند.

تصادفی به دو گروه ۷ تایی کنترل و بیمار (کبد چرب غیرالکلی با تغذیه پرچرب) تقسیم شدند (۱۴). موش‌ها در هر گروه تقریباً در بازه سنی و وزنی یکسانی قرار داشتند. موش‌ها در گروه کنترل به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی استاندارد (شامل ۱۲ درصد چربی، ۵۷ درصد کربوهیدرات، ۲۸ درصد پروتئین و ۳ درصد سایر موارد) قرار گرفتند. در حالی که در موش‌های گروه بیمار، برای القاء NAFLD موش‌ها به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (شامل ۲۲ درصد چربی، ۵۰ درصد کربوهیدرات، ۲۴ درصد پروتئین و ۴ درصد سایر موارد) قرار گرفتند. القاء کبد چرب غیرالکلی در موش‌ها بر اساس روش عفتی و همکاران انجام گردید (۱۵). پس از القاء NAFLD، موش‌ها به ۴ زیر گروه ۷ تایی به شرح زیر قرار گرفتند.

۱) گروه بیمار

۲) گروه دریافت کننده مکمل رزوراترول (RSV)

۳) گروه تمرین ورزشی تناوبی (HIT)

۴) گروه تمرین ورزشی تناوبی + مکمل رزوراترول

**روش تمرین ورزشی:** 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 دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. آشنایی با محیط آزمایشگاه و تمرین ورزشی طی یک هفته قبل از شروع آزمایش اصلی انجام گردید. برنامه تمرینی اصلی به مدت ۸ هفته بود. به‌طور خلاصه برنامه تناوبی شامل پنج جلسه در هر هفته دویدن با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد VO<sub>2</sub>max روی نوارگردان مخصوص حیوانات آزمایشگاهی بود. مدت زمان دویدن روی نوار گردان ۳۰ دقیقه (۶ دقیقه گرم کردن، ۵۰ تا ۶۰ درصد VO<sub>2</sub>max)، در هفت ست ۴ دقیقه‌ای با شدت بالا (۸۰ تا ۹۰ درصد VO<sub>2</sub>max) به دنبال ۳ دقیقه با شدت کم (۵۰ تا ۶۰ درصد VO<sub>2</sub>max) و ۶ دقیقه فرآیند سرد کرن (۵۰ تا ۶۰ دقیقه VO<sub>2</sub>max) بود. شیب نوار گردان در طول ۸ هفته بین ۵ تا ۲۰ درجه متغیر بود (۱۶ و ۱۷).

**مصرف مکمل رزوراترول:** به‌طور خلاصه، میزان یک گرم پودر

رزوراترول (شرکت نوترابو آمریکا، با درجه فارماکولوژی و خلوص ۹۹/۸۷ درصد) با غلظت ۱۰ mg/ml به عنوان استوک ساخته و سپس برای هر بار تجویز رزوراترول، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷ درصد یا DMSO ۱۰ درصد با آب به ازاء هر موش تهیه و رزوراترول را در آن معلق نموده و تجویز شد (۱۴). برای کاهش درصد خطا برای کلیه آزمودنی‌ها محلول به صورت یکجا تهیه شد. در گروه‌های مکمل و مکمل + تمرین با دوز ۲۰ میلی گرم 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 (۱۴).

ورزشی منجر به کاهش چشمگیری در میزان آپوپتوز سلول‌های قلبی می‌گردد. در همین راستا مطالعات متعددی ارتباط بین NAFLD و افزایش احتمال آپوپتوز سلولی را در انواعی از بافت‌ها به ویژه کبد بررسی کردند. برای مثال، در مطالعه‌ای Fealy و همکاران (۱۸) نشان دادند که بیماری کبد چرب با افزایش سطح سرمی Fas و FasL همراه است که منجر به القاء و افزایش آپوپتوز می‌شوند. در یک مطالعه Hajighasem و همکاران نشان دادند که سلول‌های کبدی در موش‌های مبتلا به NAFLD به‌طور معنی‌داری دچار آپوپتوز سلول‌های کبدی می‌گردد (۱۴). نتیجه مطالعه ما همسو با یافته‌های این تحقیق است؛ هر چند در تحقیق ما میزان آپوپتوز در سلول‌های قلبی مورد بررسی قرار گرفته بود.

البته با وجود مطالعات گسترده در زمینه ارتباط بین بیماری کبد چرب غیرالکلی و همچنین آپوپتوز مکانیسم واقعی این ارتباط هنوز به خوبی شناخته نشده است. به‌نظر می‌رسد که افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد و التهاب یکی از مکانیسم‌های اصلی دخیل در پاتوژنز بیماری NAFLD و همچنین بروز مشکلات قلبی باشد. افزایش سطح رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب اندامک‌های داخل سلولی از جمله غشاء میتوکنندری می‌گردد. از آنجایی که میتوکنندری به عنوان منبع تولید انرژی و همچنین مقادیر کنترل شده رادیکال‌های آزاد داخل سلولی محسوب می‌گردد؛ آسیب غشاء میتوکنندری منجر به آزادسازی سیگنال‌های آپوپتوز از جمله سیتوکروم C و همچنین تولید کنترل نشده ROS در طول زنجیره انتقال الکترون‌ها می‌گردد که در نهایت با آسیب شدیدتر سلولی و همچنین آپوپتوز یا مرگ سلولی همراه است (۱۹).

مطالعات گسترده‌ای استرس اکسیداتیو و التهاب را به عنوان عامل اصلی تشدید بیماری و اثرات ثانویه آن بر روی سایر بافت‌ها از جمله قلب می‌دانند. در همین راستا مطالعات زیادی انجام شده است. برای مثال، در یک مطالعه Ding و همکاران افزایش معنی‌داری را در غلظت مالون دی آلدئید و همچنین سطح رادیکال‌های آزاد اسیژن در بافت کبد موش‌های مبتلا به NAFLD مشاهده کردند (۲۰). در مطالعه Kumar و همکاران سطح مالون دی آلدئید (MDA) را به عنوان یک بیومارکر استرس اکسیداتیو در بافت کبدی بیماران مبتلا به NAFLD اندازه‌گیری کردند و نشان دادند که سطح MDA در بافت کبدی این بیماران به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است (۲۱). در مطالعه حاجی قاسم و همکاران در سال ۲۰۱۸ افزایش معنی‌داری در سطح TNF- $\alpha$  و کاهش چشمگیری در غلظت IL-10 بافت کبدی موش‌های مبتلا به NAFLD مشاهده شد (۱۴). از آنجایی که IL-10 دارای نقش ضدالتهابی و TNF- $\alpha$  دارای نقش القاء التهاب هستند؛ لذا کاهش سطح IL-10 و از طرفی افزایش سطح TNF- $\alpha$  در کبد

آنانلیزهای آماری: نتایج به صورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه شدند. برای بررسی معنی‌داری هر یک از متغیرهای مورد تحقیق بین گروه‌های مختلف، از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس برای آنالیز و مقایسه گروه‌ها مورد استفاده گردید. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS-20 انجام شد.

### یافته‌ها

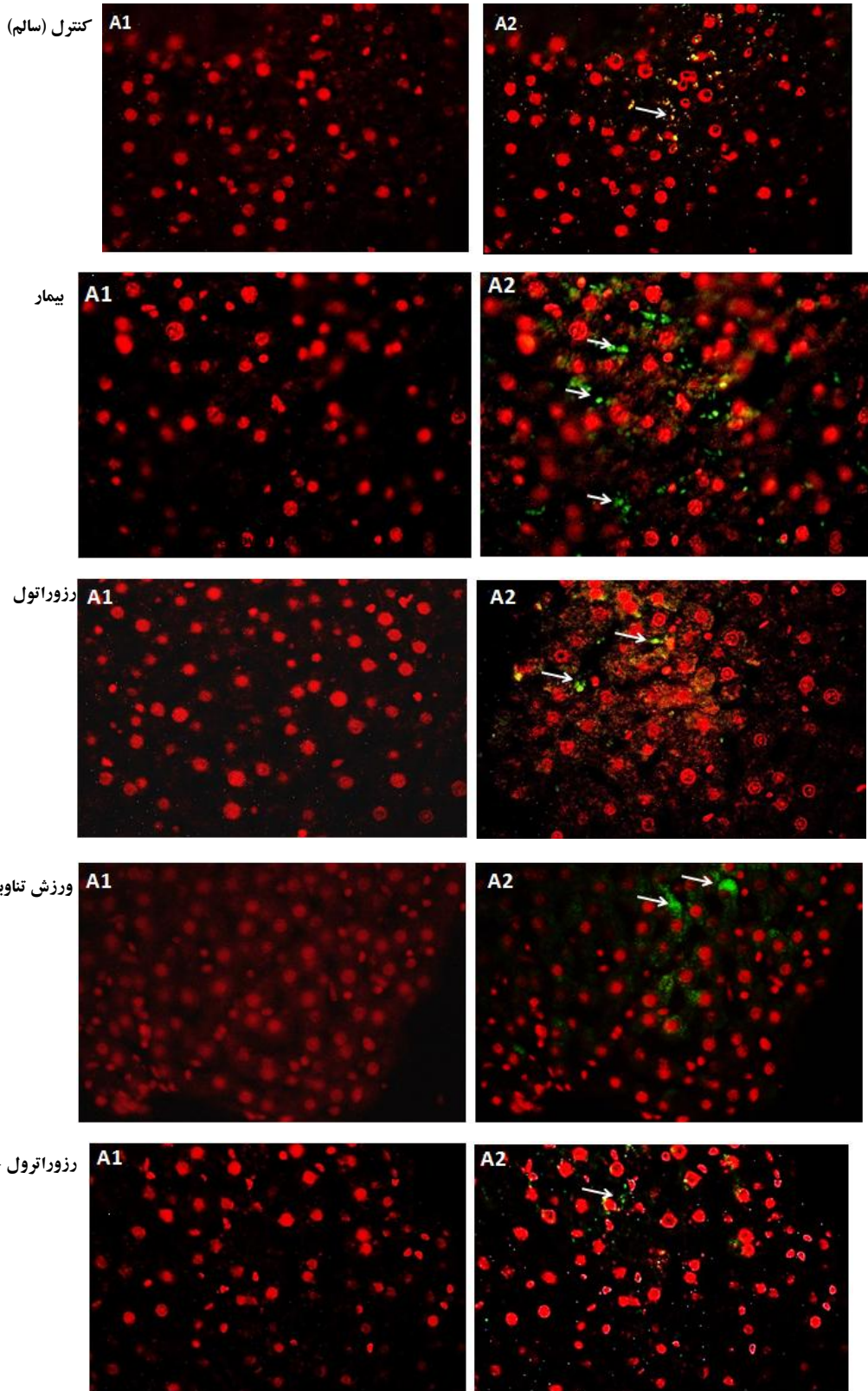
نتایج حاصل از ارزیابی روش تانل بر روی سلول‌های قلبی در هر گروه نشان داد که تعداد سلول‌های آپوپتوز شده (نقاط سبز رنگ یا فلورسنت) در گروه بیمار در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر است (شکل یک). میزان آپوپتوز سلول‌های قلبی در گروه کنترل (سالم) و رزوراترول + تمرین تناوبی در مقایسه با سایر گروه‌ها کمتر بود. همچنین میزان آپوپتوز سلول‌های قلبی در گروه دریافت‌کننده مکمل رزوراترول کمتر از گروه ورزشی بود (شکل یک).

میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در گروه کنترل (سالم)، بیمار، مکمل رزوراترول، ورزش و مکمل رزوراترول + ورزش به ترتیب برابر با  $8/94 \pm 0/34$  درصد،  $24/38 \pm 0/69$  درصد،  $9/02 \pm 0/49$  درصد تعیین شدند. مقایسه میانگین مربوط به درصد سلول‌های آپوپتوتیک قلبی در هر گروه پس از آنالیز روش تانل تفاوت آماری معنی‌داری را در میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده بین گروه‌ها نشان داد ( $P < 0/001$ ) (شکل ۲). میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در گروه بیمار به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود ( $P < 0/001$ ). تفاوت آماری معنی‌داری در میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده بین گروه کنترل (سالم) با گروه‌های رزوراترول + ورزش تناوبی و مکمل رزوراترول مشاهده نگردید. میانگین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در گروه‌های کنترل، رزوراترول + ورزش و مکمل رزوراترول به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های بیمار ( $P < 0/001$ ) و صرفاً ورزش تناوبی ( $P < 0/05$ ) بود. اگرچه ترکیب مکمل رزوراترول + ورزش در مقایسه با مصرف صرفاً رزوراترول سبب کاهش بیشتری در میانگین درصد سلول‌های مرده گردید؛ اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود.

### بحث

در این مطالعه اثر NAFLD بر روی آپوپتوز سلول‌های قلبی در موش‌ها به روش تانل مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس در مرحله بعدی تاثیر تقویتی ورزش تناوبی و مکمل رزوراترول به صورت جداگانه و همچنین ترکیبی بر روی میزان آپوپتوز سلول‌ها بررسی شد. نتایج تحقیق ما نشان داد که NAFLD با افزایش آپوپتوز سلول‌های قلبی همراه است. از طرفی نتایج یافته‌های ما نشان داد که مصرف مکمل رزوراترول به تنهایی و به ویژه در ترکیب با تمرین





شکل ۱: بررسی تانل سلول‌های قلبی در گروه‌های مورد مطالعه  
A1: Nuclei stained by PI and A2: Merge

موش‌های مبتلا به NAFLD مشاهده کردند که با افزایش فیلتراسیون سلول‌های التهابی و همچنین افزایش معنی‌داری در سطح سرمی آنزیم‌های کبدی، لپتین، کلسترول، تری‌گلیسرید و MDA بود (۲۲).

موش‌های مبتلا به NAFLD احتمالاً یکی از دلایل افزایش التهاب در آنها است. به‌طور مشابهی، El-Din و همکاران در سال ۲۰۱۴ افزایش سطح مدیاتورهای التهابی نظیر TNF-a و TNF-b را در کبد

با کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و بیان سیتوکاین‌های التهابی و همچنین افزایش مدیاتورهای ضدالتهابی و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو می‌گردد (۲۳). در مطالعه Fealy و همکاران انجام فعالیت فیزیکی کوتاه مدت منجر به کاهش آپوتوز سلول‌های کبدی در موش‌های مبتلا به NAFLD گردید (۱۸). در مطالعه Tung و همکاران درمان ترکیبی با رزوراتول و تمرین‌های ورزشی خواص ضدپیری داشت و سبب حفظ فعالیت بالای GSH، آنزیم گلو‌تاتیون پراکسیداز و گلو‌تاتیون-S-ترانسفراز در حیوانات مسن گردید (۲۴).

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و پژوهش‌های قبلی، ما اظهار می‌کنیم که درمان ترکیبی با رزوراتول و تمرین ورزشی تناوبی سبب کاهش آپوتوز سلول‌های قلبی می‌تواند سبب بهبود شدت بیماری در افراد مبتلا به NAFLD گردد. هر چند از محدودیت‌های این مطالعه عدم بررسی برخی از بیومارکرهای آپوتوز از جمله پروتئین‌های Bax و Bcl2 بود که می‌تواند در مطالعات بعدی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. از طرفی عدم بررسی هیستولوژی در جهت تأیید القاء کبد چرب غیرالکلی از دیگر محدودیت‌های این تحقیق محسوب می‌گردد. همچنین بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و التهاب در بافت قلب نیز برای بررسی یکی از مکانیسم‌های احتمالی NAFLD بر روی قلب در مطالعات بعدی توصیه می‌گردد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بیماری NAFLD با افزایش سطح آپوتوز سلول‌های قلبی همراه است. اگرچه تجویز رزوراتول می‌تواند به عنوان یک ترکیب با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بالا سبب آپوتوز در سلول‌های قلبی بیماران NAFLD گردد؛ اما درمان ترکیبی رزوراتول و تمرین ورزشی تناوبی، احتمالاً سبب کاهش بیشتر میزان آپوتوز در سلول‌های قلبی در بیماران NAFLD می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۲۰۸۲۱۴۰۷۹۷۱۰۰۸) آقای حسین مهدیان برای اخذ درجه دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری بود. هیچگونه اختلاف نظری بین نویسندگان وجود ندارد. بدین وسیله از همه اعضای مرکز فیزیولوژی ورزشی تشکر می‌نمایم.

### References

- Chan WK, Dan YY, Wong VW; GO ASIA Initiative. Editorial: NAFLD in Asia-clinical associations with advanced disease become clearer. Authors' reply. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018 Apr; 47(7): 1037-38. doi: 10.1111/apt.14572
- B I nescu A, B I nescu P, Com nici V, Stan I, Acs B, Pris cariu L, et al. Lipid profile pattern in pediatric overweight population with or without NAFLD in relation to IDF criteria for

لذا این نتایج گویای آن است که افزایش سطح استرس اکسیداتیو و التهاب در بیماری NAFLD احتمالاً به عنوان یکی از مکانیسم‌های اثر آن بر روی سایر بافت‌ها به‌ویژه بافت قلبی است که می‌تواند نهایتاً منجر به آپوتوز و مرگ سلول‌های قلبی شود. هر چند این موضوع نیازمند مطالعه بیشتری در آینده است.

با توجه به این که یکی از مکانیسم‌های احتمالی NAFLD از طریق استرس اکسیداتیو واسطه می‌گردد؛ مطالعات متعددی تاثیر انواعی از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین تمرین‌های ورزش را بر روی بهبود شدت این بیماری بررسی کردند. در تحقیق کنونی، اثرات درمانی رزوراتول به تنهایی و یا همراه با ورزش‌های تناوبی و تداومی در کاهش سطح آپوتوز سلول‌های قلبی در موش‌های مبتلا به NAFLD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق ما نشان داد که تجویز رزوراترول به تنهایی و به‌ویژه در ترکیب با تمرین ورزشی سبب کاهش معنی‌دار میزان آپوتوز سلول‌های بافت قلب در موش‌های مبتلا به NAFLD می‌گردد. اگرچه تجویز رزوراترول به تنهایی سبب کاهش آپوتوز سلول‌های قلبی شده بود؛ اما تجویز ترکیبی رزوراترول همراه با ورزش تناوبی تا حدودی اثر قوی‌تری نشان داده بود. نتایج تحقیق ما قابل مقایسه با یافته‌های حاصل از برخی مطالعات قبلی است. برای مثال، در مطالعه Seya و همکاران (۵) اثر مثبت تجویز رزوراترول در کاهش آپوتوز سلول‌های کاردیومیوسیت مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد تجویز همزمان رزوراترول همراه با تمرین ورزشی با افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کاهش میزان آپوتوز سلولی می‌گردد. مطالعات متعددی تاثیر ترکیبی مکمل رزوراترول و ورزش را در بهبود بیماری‌های مختلف بررسی کردند. برای مثال، در مطالعه حاجی‌قاسم و همکاران تجویز رزوراترول به تنهایی و یا همراه با تمرین ورزشی بر روی تعداد سلول‌های آپوتوز شده سلول‌های کبدی و همچنین مارکرهای استرس اکسیداتیو و التهابی مورد بررسی قرار گرفت (۱۴). نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز رزوراترول، به‌ویژه به صورت ترکیبی با تمرین ورزشی، با افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و همچنین سطح مدیاتور ضدالتهابی IL-10 همراه بوده است. در حالی که سطح مدیاتور التهابی TNF-a، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تعداد سلول‌های آپوتوز کبدی به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود (۱۴). در پژوهش دیگری Wang و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که رزوراترول

metabolic syndrome: a preliminary study. *Rom J Intern Med*. 2018 Mar; 56(1): 47-54. doi: 10.1515/rjim-2017-0040

- Chaudhury CS, Purdy JB, Liu CY, Morse CG, Stanley TL, Kleiner D, et al. Unanticipated increases in hepatic steatosis among human immunodeficiency virus patients receiving mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2018 May; 38(5): 797-802. doi:

10.1111/liv.13734

4. 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 Apr; 959: 93-107. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02086.x

5. Seya K, Kanemaru K, Sugimoto C, Suzuki M, Takeo T, Motomura S, et al. Opposite effects of two resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) tetramers, vitisin A and hopeaphenol, on apoptosis of myocytes isolated from adult rat heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Jan; 328(1): 90-8. doi: 10.1124/jpet.108.143172

6. Wang CC, Lin SK, Tseng YF, Hsu CS, Tseng TC, Lin HH, et al. Elevation of serum aminotransferase activity increases risk of carotid atherosclerosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Aug; 24(8): 1411-16. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05872.x

7. Shaikh AH, Aatif S, Ahmed T. Carotid Intima-Media Thickness in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Basic Appl Sci.* 2013; 9: 333-36.

8. Vlachopoulos C, Manesis E, Baou K, Papatheodoridis G, Koskinas J, Tiniakos D, et al. Increased arterial stiffness and impaired endothelial function in nonalcoholic Fatty liver disease: a pilot study. *Am J Hypertens.* 2010 Nov; 23(11): 1183-89. doi: 10.1038/ajh.2010.144

9. Caserta CA, Pendino GM, Amante A, Vacalebri C, Fiorillo MT, Surace P, et al. Cardiovascular risk factors, nonalcoholic fatty liver disease, and carotid artery intima-media thickness in an adolescent population in southern Italy. *Am J Epidemiol.* 2010 Jun; 171(11): 1195-202. doi: 10.1093/aje/kwq073

10. Khan RS, Newsome PN. NAFLD in 2017: Novel insights into mechanisms of disease progression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Feb; 15(2): 71-72. doi: 10.1038/nrgastro.2017.181

11. Rietman A, Sluik D, Feskens EJM, Kok FJ, Mensink M. Associations between dietary factors and markers of NAFLD in a general Dutch adult population. *Eur J Clin Nutr.* 2018 Jan; 72(1): 117-23. doi: 10.1038/ejcn.2017.148

12. Zhang Z, Wang J, Wang H. Correlation of blood glucose, serum chemerin and insulin resistance with NAFLD in patients with type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med.* 2018 Mar; 15(3): 2936-40. doi: 10.3892/etm.2018.5753

13. Wu B, Ma Y, Yi Z, Liu S, Rao S, Zou L, et al. Resveratrol-decreased hyperalgesia mediated by the P2X7 receptor in gp120-treated rats. *Mol Pain.* 2017 Jan-Dec; 13: 1744806917707667. doi: 10.1177/1744806917707667

14. 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.* 2019 May; 125(2): 142-49. doi:

10.1080/13813455.2018.1441872

15. Efati M, Khorrami M, Zarei Mahmmodabadi A, Raouf Sarshoori J. [Induction of an Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using a Formulated High-Fat Diet]. *J Babol Univ Med Sci.* 2016; 18(11): 57-62. doi: 10.22088/jbums.18.11.57 [Article in Persian]

16. 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 Sep; 41(9): 945-52. doi: 10.1139/apnm-2016-0037

17. 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.* 2018 Feb; 184: 6-11. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.10.027

18. Fealy CE, Haus JM, Solomon TP, Pagadala M, Flask CA, McCullough AJ, et al. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Jul; 113(1): 1-6. doi: 10.1152/jappphysiol.00127.2012

19. Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, Klaikeaw N. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct; 13(38): 5127-32.

20. 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. doi: 10.1038/srep28734

21. 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 Mar; 3(1): 12-18. doi: 10.1016/j.jceh.2012.10.009

22. 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 Aug; 44(2): 295-308.

23. 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 Jan; 282: 100-108. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.10.021

24. Tung BT, Rodríguez-Bies E, Ballesteros-Simarro M, Motilva V, Navas P, López-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 Apr; 69(4): 398-409. doi: 10.1093/gerona/glt102