

## تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا بر برخی از عوامل بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH)

علیرضا جوهری<sup>۱</sup>، فرهاد دریانوش<sup>۲\*</sup>، مریم کوشکی جهرمی<sup>۱</sup>، علی‌اکبر نکوئیان<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

**مقدمه:** تجمع چربی در بافت کبد به عنوان مهم‌ترین علت بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) شناخته می‌شود که با کاهش پروتئین گیرنده‌های فعال تکثیرکننده پراکسی‌زوم کبدی (PPAR- $\alpha$ ) همراه است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا (HIST) بر PPAR- $\alpha$  و آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی NASH ناشی از رژیم غذایی پرچرب (HFD) انجام شد.

**روش بررسی:** تحقیق حاضر از نوع نیمه‌تجربی بود. ۴۰ سر رت نر نژاد اسپراگوداولی (سن: ۶ تا ۸ هفته و وزن  $20 \pm 230$  گرم) اختیار شد. سپس به دو گروه مساوی سالم و HFD تقسیم شدند. گروه HFD با هدف القا بیماری، به مدت هشت هفته تحت گاوژ قرار گرفتند. پس از اثبات بیماری، رت‌ها به چهار گروه کنترل-سالم ( $n=9$ )، سالم-شنا ( $n=9$ )، کنترل-بیمار ( $n=9$ ) و بیمار-شنا ( $n=9$ ) تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی، HIST را هشت هفته (سه جلسه در هفته و هر جلسه ۳۰ دقیقه) انجام دادند. در پایان، PPAR- $\alpha$  کبدی از روش وسترن بلات و آنزیم‌های ALT (Alanine aminotransferase)، AST (Aspartateaminotransferase) و GGT (Gama-Glutamyl Transferase) در سطح سرم از روش فوتومتریک اندازه‌گیری شدند. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. سطح معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) و کلیه روش‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار version 16 SPSS انجام شد.

**نتایج:** HIST، افزایش وزن ناشی از HFD را کنترل کرد و کاهش معنی‌دار ALT و AST سرم در گروه‌های سالم-شنا و بیمار-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار و کاهش معنی‌دار GGT سرم در سالم-شنا نسبت به کنترل-بیمار ( $P \leq 0.001$ ) و بیمار-شنا ( $P \leq 0.044$ ) مشاهده شد. افزایش معنی‌دار PPAR- $\alpha$  کبدی در سالم-شنا نسبت به کنترل-بیمار مشاهده گشت ( $P \leq 0.002$ ). نتیجه‌گیری: HIST می‌تواند وزن بدن را کنترل کند و آنزیم‌های کبدی را کاهش دهد. با این حال برای حصول نتایج قطعی تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

**واژه‌های کلیدی:** استئاتوهپاتیت غیرالکلی، شنای تناوبی با شدت بالا، پروتئین گیرنده‌های فعال تکثیرکننده پراکسی‌زوم کبدی، آنزیم‌های کبدی

**ارجاع:** جوهری علیرضا، دریانوش فرهاد، کوشکی جهرمی، نکوئیان علی‌اکبر. تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا بر برخی از عوامل بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۱۰): ۵۱-۶۰۳۴.

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۷۳۰۱۴۰۳۲، پست الکترونیکی: daryanoosh@shirazu.ac.ir، صندوق پستی: ۷۱۸۴۹۵۷۴۳۵

در تنظیم متابولیسم لیپیدهای کبدی نقش اساسی دارد (۷). در یک مطالعه طولی پس از یک سال پیگیری نشان داده شد که با افزایش PPAR $\alpha$ ، بهبود در NASH افزایش می‌یابد (۸). همچنین در پژوهشی هنگامی که حیوانات را در گروه رژیم غذایی با چربی بالا یا گروه رژیم غذایی استاندارد در معرض ورزش منظم شنا به مدت ۱۲ هفته قرار دادند، در هر دو گروه بیان ژن mRNA PPAR $\alpha$  کبدی افزایش یافت (۹). تغییر در شیوه زندگی با هدف افزایش فعالیت بدنی و کاهش کالری دریافتی با هدف تعادل انرژی منفی برای از دست دادن و یا حفظ توده بدون چربی بدن است. بنابراین، بهبود تمرینات بدنی منظم به یک استراتژی مهم برای درمان غیردارویی بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی تبدیل شده است (۳،۴). فعالیت‌های ورزشی باعث کاهش آنزیم‌های کبدی از جمله آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) و کاهش میزان چربی و تری‌گلیسیرید کبد می‌شود (۱۰). از سوی دیگر در مطالعه‌ای که اثر فعالیت ورزشی بر حجم و چربی کبد در بیماران NASH بررسی کردند به این نتیجه رسیدند که چربی و حجم کبد و همچنین شاخص توده بدن افراد کاهش معنی‌دار یافته بود اما سطوح آنزیم‌های AST و ALT و GGT تغییری نکرده بود (۱۱). با وجود نتایج متناقض تحقیقات اخیر، محققان همواره به دنبال بهترین پروتکل تمرینی از نظر نوع، شدت، حجم و مدت فعالیت بوده‌اند. تمرینات تناوبی با شدت بالا (High-Intensity Interval Training) به‌عنوان یک روش تمرینی جدید هوازی شناخته شده است. این نوع تمرینات شامل دوره‌های تلاش حداکثری با فواصل استراحت فعال یا غیرفعال میان این دوره‌هاست (۱۲). در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است که تمرینات تناوبی با شدت بالا موجب کاهش توده چربی احشایی و چربی کل بدن، کاهش چربی کبد و بهبود سفتی آن می‌گردد و به‌عنوان یک شیوه درمان غیردارویی موثر در درمان استئاتوهپاتیت غیرالکلی در بیمارانی که برای انجام فعالیت

عدم تعادل در متابولیسم اسیدهای چرب در ارتباط با بافت چربی، بافت کبد و التهاب سیستمیک، عوامل کلیدی برای ایجاد مقاومت به انسولین، دیس‌لیپیدمی و سایر عوامل خطر قلبی-عروقی مرتبط با بیماری کبد چرب غیرالکلی (nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) هستند (۱). این بیماری یک وضعیت روبه افزایش است که با سبک زندگی کم‌تحرک و عادات غذایی اشتباه همراه است و شیوع بالایی در سراسر جهان دارد (۲). NAFLD با تجمع تری‌گلیسیریدها در سلول‌های کبدی به شکل لیپیدهای ماکرو و میکرو ویزیکول با علائم خوش‌خیم، همراه با التهاب متعاقب با استئاتوهپاتیت غیرالکلی (Non-alcoholic issteatohepatit مشخص می‌شود که می‌تواند منجر به فیروز، سیروز و نارسایی کبدی شود (۳). استئاتوهپاتیت غیرالکلی نتیجه افزایش جذب چربی کبدی، افزایش لیپوژنز و ذخیره چربی در کبد است. مصرف بی‌رویه مواد غذایی پرچرب و کاهش فعالیت بدنی منجر به افزایش لیپوژنز در کبد می‌شود و در نتیجه به‌میزان قابل‌توجهی تری‌گلیسیرید و سایر گونه‌های چربی در سلول‌های کبد تجمع پیدا می‌کنند (۴). گیرنده فعال تکثیرکننده پراکسی‌زوم آلفا (PPAR $\alpha$  peroxisome receptor $\alpha$  proliferator-activated از خانواده گیرنده‌های هسته‌ای PPAR است و در سلول‌های کبدی بیان می‌شود و در اثر اتصال توسط اسیدهای چرب فعال می‌شود و جذب و استفاده اسید چرب آزاد را از طریق چرخه اکسیداسیون بتا و کتوژنز افزایش می‌دهد در نتیجه هموستاز چربی کبد را بر عهده دارد (۵). با افزایش NASH، PPAR $\alpha$  کاهش می‌یابد و این موضوع باعث افزایش تجمع هر چه بیشتر چربی در سلول‌های کبدی می‌شود (۴). فعال‌سازی PPAR $\alpha$  باعث رونویسی از طیف وسیعی از ژن‌های مرتبط با اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و سیتوکروم‌ها می‌شود، در نتیجه سطح چربی‌های کبدی کاهش می‌یابد (۶). در مطالعه‌ای که روی موش‌ها انجام شد به دنبال غیرفعال‌سازی PPAR $\alpha$ ، استئاتوز کبدی به‌وجود آمد و دریافتند که

سر موش صحرایی نر (سن: ۶ تا ۸ هفته) از نژاد Sprague – Dawley با میانگین وزن  $20 \pm 230$  گرم انتخاب شدند. موش‌های صحرایی در حیوان‌خانه دانشگاه شیراز با دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲ نگهداری شدند. غذای حیوانات به صورت آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. هم‌چنین آب مورد نیاز حیوانات به صورت آزادانه در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آن‌ها قرار داده شد. موش‌های صحرایی انتخاب‌شده به دو گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند. گروه اول گروه سالم، ماندند ( $n=20$ ) و غذای استاندارد دریافت کردند. گروه دوم طی مدت هشت هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (High HFD: fat diet) قرار گرفتند تا بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی در آن‌ها القا شود ( $n=20$ ). رژیم پرچرب به کار رفته در تحقیق حاضر به صورت امولسیون (به حالت مایع با ویسکوزیته بالا) استفاده شد و با استفاده از روش گاواژ روزانه (به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به موش‌های صحرایی گروه رژیم غذایی پرچرب ( $n=20$ ) خوراند می‌شد. محتوای امولسیون پرچرب از ۷۷ درصد چربی، ۱۴ درصد پروتئین و ۹ درصد کربوهیدرات‌ها تشکیل گردید. محتوای این امولسیون شامل روغن ذرت، ساکارز، پودر شیر خشک، کلسترول، سدیم دزوکسی‌کولات، توئین ۸۰، پروپیلین گلیکول، مخلوط ویتامین و مواد معدنی و آب مقطر بود. در این امولسیون، پروتئین‌ها توسط پودر شیر خشک، کربوهیدرات‌ها توسط ساکاروز و چربی توسط روغن ذرت و پودر کلسترول تأمین شدند. هر وعده با مخلوطی از ویتامین و مواد معدنی تکمیل شد. این امولسیون در دمای چهار درجه سانتی‌گراد ذخیره، در حمام آب با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گرم و قبل از استفاده کاملاً میکس و مخلوط شد (۲۲). در گروه رژیم پرچرب علاوه بر غذای روزانه استاندارد جوندگان، به صورت خوراکی و توسط تکنیک گاواژ، موش‌های صحرایی با امولسیون پرچرب (۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) یک بار در روز تحت گاواژ قرار گرفتند. این شیوه تغذیه‌ای

ورزشی با کمبود وقت مواجه هستند، معرفی شد (۱۳،۱۴). اما در مقابل برخی پژوهش‌ها پس از بررسی این نوع تمرینات، عدم تغییر در چربی احشایی، شاخص توده بدنی، آنزیم‌های ALT و AST، GGT و هم‌چنین نشانگرهای التهابی را گزارش کردند (۱۷-۱۵). از طرف دیگر انجام تمرینات HIIT در خشکی با مشکلات و موانعی همراه است. به‌گونه‌ای که افراد چاق مبتلا به NASH به دلیل سنگینی وزن آن‌ها و ماهیت پرشدت بودن این مدل فعالیت، خطر ایجاد صدمه برای آن‌ها به‌وجود می‌آید (۱۸). از جهت افزایش ایمنی و کاهش صدمات ناشی از این نوع تمرینات برخی مطالعات به تحقیق درباره مقایسه فعالیت‌های ورزشی هوازی در آب و خشکی و بررسی اثرات ورزش در آب بر برخی از بیماری‌های متابولیکی از جمله دیابت، چاقی، سندروم متابولیک و فشارخون پرداخته‌اند. آب به دلیل خواص بی‌نظیر هیدرودینامیکی و ایجاد شرایط بی‌وزنی باعث کاهش صدمات ناشی از تمرینات HIIT در مقایسه با خشکی می‌شود (۱۸). هم‌چنین در محیط آبی همانند محیط خشکی می‌توان انواع فعالیت‌های ورزشی هوازی و بی‌هوازی با وزن بدن انجام داد (۲۱-۱۹) با این وجود تمام این تحقیقات اظهار داشتند که بهینه‌ترین پروتکل تمرین از نظر نوع، شدت، حجم و مدت فعالیت هم‌چنان ناشناخته است (۱۳،۱۸،۱۹). با توجه به نتایج متناقض تحقیقات در زمینه تاثیرات شنا بر انواع بیماری‌ها و اثرات مبهم آن در مقایسه با ورزش در محیط خشکی و هم‌چنین نیافتن تحقیقی در زمینه تاثیر تمرینات شنای تناوبی با شدت بالا بر کبد چرب بیماران مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی توسط محققین تحقیق حاضر، لذا این محققان برای مشخص کردن کارایی و اثربخشی این مدل تمرین بر بهبود NASH از جنبه سلولی-مولکولی در بافت کبد، تاثیر شنای تناوبی با شدت بالا بر عامل پروتئینی PPAR $\alpha$  و آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده با رژیم پرچرب را بررسی کردند.

### روش بررسی

پژوهش حاضر با توجه به هدف از نوع توسعه‌ای-بنیادی و با در نظر گرفتن روش از نوع نیمه‌تجربی بود. در این پژوهش، ۴۰

دقیقه به‌طور متناوب شنا کردند. در هفته دوم وقتی که موش‌های صحرایی به‌خوبی با استخر حیوانات آشنا شدند؛ برای آشنایی با نوع تمرین تناوبی، چندین مرتبه بعد از یک دقیقه شنا به‌وسیله صفحه استراحت از آب بیرون آورده و دوباره در آب قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان آخرین جلسه آشنایی، موش‌های صحرایی گروه تمرین، ابتدا پنج دقیقه گرم‌کردن و سپس تمرین اصلی HIIT شنا، شامل ۲۰ نوبت ۳۰ ثانیه‌ای شنا با ۳۰ ثانیه استراحت بین هر نوبت را انجام دادند. در پایان هر برنامه تمرینی نیز پنج دقیقه عمل سردکردن اعمال شد و سپس تمام موش‌های صحرایی کاملاً خشک شده و به قفس‌هایشان منتقل شدند. این برنامه ورزشی به‌مدت هشت هفته (سه روز در هفته، روزهای زوج) انجام شد. در تمرین تناوبی بار اعمال شده در هفته اول، وزنه‌ای به‌میزان هفت درصد وزن بدن هر موش صحرایی بود و هر هفته یک درصد به آن اضافه شد؛ به‌طوری‌که در هفته آخر (هشتم) موش‌های صحرایی با وزنه‌ای به‌میزان ۱۴ درصد وزن بدن خود که به ریشه دم آن‌ها بسته شد، شنا کردند (جدول ۱) (۲۴). تمرینات، عصرهنگام (بهترین زمان تمرین در ریتم فعالیت طبیعی موش‌های صحرایی) انجام شد (۲۵).

به‌مدت هشت هفته ادامه داشت تا بر اساس پژوهش Zou و همکاران (۲۰۰۶)، در موش‌های صحرایی که رژیم غذایی پرچرب مصرف می‌کردند (HFD: n=۲۰) بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی القا شود (۲۲). به موش‌های صحرایی گروه سالم (n=۲۰) نیز از طریق تکنیک گاواژ، روزانه مقدار مساوی محلول نمک (سالین) داده شد. پس از اثبات القا بیماری در موش‌های صحرایی (یافته‌های مربوط به اثبات بیماری در قسمت نتایج آمده است)، گروه بیمار (رژیم پرچرب) به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل-بیمار (n=۹)، بیمار-شنا (n=۹) و گروه سالم نیز به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل-سالم (n=۹)، گروه سالم-شنا (n=۹) تقسیم شدند. لازم به ذکر است رژیم غذایی پرچرب گروه‌های بیمار تا پایان دوره تمرینات ادامه داشت. پس از تقسیم‌بندی گروه‌ها، همه موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین به‌مدت دو هفته مرحله آشنایی با استخر حیوانات (قطر ۱۶۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر) را قبل از شروع تمرین اصلی گذراندند (۲۳). در هفته اول موش‌های صحرایی با نهایت دقت و آرامش در استخر حیوانات با عمق آب ۵۰ سانتی‌متر و میانگین دمای  $20 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و با سرعت دلخواه به مدت ۲۰

جدول ۱: پروتکل تناوبی شنا با شدت بالا

هفته‌ها	تعداد (نوبت)	مدت تلاش (ثانیه)	مدت استراحت (ثانیه)	میزان اضافه بار (درصد وزن بدن)
هفته اول	۲۰	۳۰	۳۰	۷
هفته دوم	۲۰	۳۰	۳۰	۸
هفته سوم	۲۰	۳۰	۳۰	۹
هفته چهارم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۰
هفته پنجم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۱
هفته ششم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۲
هفته هفتم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۳
هفته هشتم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۴

بلات به‌ترتیب شامل لیزکردن بافت، تعیین غلظت پروتئین به‌وسیله بردفورد، تهیه غلظت‌های مختلف BSA برای کشیدن منحنی استاندارد، غلظت‌های پروتئین، آب و سمپل بافر، آماده‌سازی نمونه، ساخت الکتروفورز بر روی ژل SDS page، تهیه محلول‌ها، روش انجام آزمایش و ساختن ژل پایین و بالا، الکترو فوز بر ژل SDS page، وسترن بلات یا ایمونوبلاتینگ، مرحله انتقال از ژل به کاغذ، مرحله بلاکینگ، مرحله انکوبه کردن با آنتی‌بادی اولیه (sc-47778,  $\beta$ -Actin (C4): PPAR $\alpha$  (H-2): m-IgGk (sc-398394)، مرحله انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه (BP-HRP: sc-516102, mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357)، مرحله آشکارسازی، مرحله ظهور فیلم در تاریک‌خانه، روش Striping بود.

### تجزیه و تحلیل آماری

در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی، میانگین، انحراف استاندارد و نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی اطلاعات جمع‌آوری شده برای تعیین نحوه توزیع داده‌ها از آزمون شپرو-ویلک استفاده شد. در صورت طبیعی بودن یافته‌ها، از روش تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها، از آزمون تعقیبی بونفرونی برای تعیین محل دقیق تفاوت‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) در نظر گرفته شد. کلیه روش‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2019 کمک گرفته شد.

### ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد تایید قرار گرفته است (IR.SUMS.REHAB.REC.1400.008).

### نتایج

در نمودار ۱ انحراف معیار  $\pm$  میانگین وزن گروه‌های سالم ( $n = 20$ ) و رژیم پرچرب (HFD) ( $n = 20$ )، در مدت هشت هفته القا رژیم پرچرب نمایش داده شده است. اولین هفته به عنوان سازگاری رت‌ها با محیط آزمایشگاه در نظر گرفته شد و

وزن موش‌های صحرایی از روز اول شروع دوره تحقیق و سپس هر هفته در روزهای جمعه، عصر هنگام مورد سنجش قرار می‌گرفت و تا پایان دوره تحقیق و روز تشریح این روند ادامه داشت. پس از به‌دست آوردن وزن هر یک از موش‌های صحرایی در هر گروه، میانگین وزنی هر گروه مشخص شده و ثبت می‌شد. یافته‌های مربوط به میانگین وزن گروه‌های تحقیق در نمودار ۱ و ۲، قسمت نتایج گزارش شده است. در مدت دوره تداخل، گروه‌های کنترل-سالم و کنترل-بیمار هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، بعد از ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (سه تا پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. ابتدا نمونه‌های خونی از قلب رت‌ها به‌میزان ۵ سی‌سی گرفته شد؛ بلافاصله آن را در داخل لوله آزمایش ژل کلات اکتیویتر انتقال داده و سپس توسط سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن توسط سمپلر به میکروتیوب‌های ۲ سی‌سی سرم خون منتقل شد و برای آنالیز نهایی در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس بافت کبد از بدن حیوانات استخراج و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد و سپس بلافاصله در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شد. با استفاده از روش آزمایشگاهی فتومتریک، آنزیم‌های AST و ALT توسط کیت‌های تشخیصی از شرکت پارس‌آزمون (شماره سفارش: ۱۱۸۴۰۰) و آنزیم GGT از شرکت بایرکس فارس (کد محصول: BXC0362) از سرم خون اندازه‌گیری شد. هم‌چنین جهت اندازه‌گیری پروتئین بافتی، بافت کبد پس از جداسازی، در محلول نرمال سالین شستشو داده شد و بلافاصله در تانک ازت در دمای منهای ۱۹۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس جهت انجام تکنیک وسترن بلات و آنالیزهای نهایی پروتئین PPAR- $\alpha$ ، به آزمایشگاه منتقل شد. به‌طور کلی مراحل انجام تکنیک وسترن

از پارانشیم کبدی را اشغال می‌کند. درجه دو، ۳۴ تا ۶۶ درصد از پارانشیم کبدی. درجه سه، بیش از ۶۶ درصد از پارانشیم کبدی. برای انفیلتراسیون التهاب سلولی: درجه صفر: هیچ foci/field. درجه یک، ۱-۲ foci/field. درجه ۲، ۳-۴ foci/field. درجه ۳، بیش از ۴ foci/field. مرحله‌بندی فیروز کبدی با رنگ‌آمیزی Oil red O به شرح زیر بررسی شد: صفر، هیچ؛ یک، خفیف، منطقه (zone) ۳، پری‌سینوزوئیدال (perisinusoidal)؛ دو، متوسط، منطقه ۳، پری‌سینوزوئیدال؛ سه، پورتال/پری‌پورتال؛ چهار، فیبروزیس (bridging fibrosis) (۲۷). همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است در نمونه‌های بیمار ۱ و ۲ پس از هشت هفته تغذیه با رژیم پرچرب نمره استئاتوزیس و التهاب، مقادیر سرمی ALT و AST و هم‌چنین آنالیز بافتی کبد نشان داد که کبد رت‌ها در مرحله دوم فیبروزیس قرار دارد. نمودار ۲، وزن گروه‌های تحقیق پس از اثبات بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی و تقسیم‌بندی تصادفی آن‌ها به چهار گروه کنترل-سالم (n=۹)، سالم-شنا (n=۹)، کنترل-بیمار (n=۹) و بیمار-شنا (n=۹)، نشان می‌دهد. در این نمودار هفته‌های اول و دوم جهت آشنایی و سازگاری موش‌های صحرایی با محیط استخر و نوع تمرین در نظر گرفته شد. هفته‌های یک تا هشت، بازه تمرین اصلی مطابق پروتکل ارائه شده بود و هفته نهم، هفته تشریح موش‌های صحرایی گروه‌های آزمایش بود. بر اساس میانگین وزن هر گروه در کل دوره مداخله تمرینی، مشخص شد که بین گروه‌های کنترل-سالم و سالم-شنا ( $P \leq 0.003$ ) و بین گروه‌های کنترل-بیمار و سالم-شنا ( $P \leq 0.002$ ) تفاوت معنی‌دار وجود دارد. میان گروه سالم-شنا با بیمار-شنا کاهش غیر معنی‌دار ( $P \geq 0.092$ ) مشاهده شد. بر اساس نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، می‌توان گفت تفاوت معنی‌داری بین میانگین متغیر PPAR $\alpha$  ( $P \leq 0.001$ )، در گروه‌های تحقیق وجود داشت. با توجه به نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی، نتایج شکل ۳ و نمودار ۳، در پروتئین PPAR- $\alpha$  بافت کبد، بین گروه کنترل-سالم با گروه‌های کنترل-بیمار ( $P \leq 0.001$ )، بیمار-شنا ( $P \leq 0.001$ ) و هم‌چنین در گروه سالم-شنا نسبت به گروه‌های

پس از آن دوره هشت هفته‌ای القا رژیم پرچرب ادامه یافت. در پایان دوره القا بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی، جهت اثبات ایجاد بیماری NASH، به‌طور تصادفی از گروه بیمار (n=۲) و سالم (n=۲)، جداگانه، دو رت قربانی شدند و به‌عنوان نمونه، در شکل ۱ کبد بیمار با کبد سالم از نظر ظاهری با هم مقایسه شده است و مشخص است که رنگ کبد بیمار به‌دلیل تجمع بالای تری‌گلیسیرید در آن متمایل به سفید و رنگ کبد سالم به‌دلیل عدم تجمع تری‌گلیسیرید به رنگ قرمز می‌باشد. پس از اثبات ظاهری کبد به اثبات پاتولوژی و بیوشیمیایی بافت کبد توسط متخصص پاتولوژیست پرداخته شد. در شکل ۲ نتایج رنگ‌آمیزی Oil red O بافت کبد بیمار و سالم با هم مقایسه و گزارش شده است. همان‌گونه که مشهود است تعداد نقطه‌های قرمز رنگ در نمونه کبد بیمار نشان‌دهنده میزان تجمع تری‌گلیسیرید در این بافت است با این‌حال در نمونه کبد سالم هیچ نوع نقطه قرمز رنگی مشاهده نمی‌شود و نشان‌دهنده عدم تجمع تری‌گلیسیرید در نمونه بافت کبد سالم است.

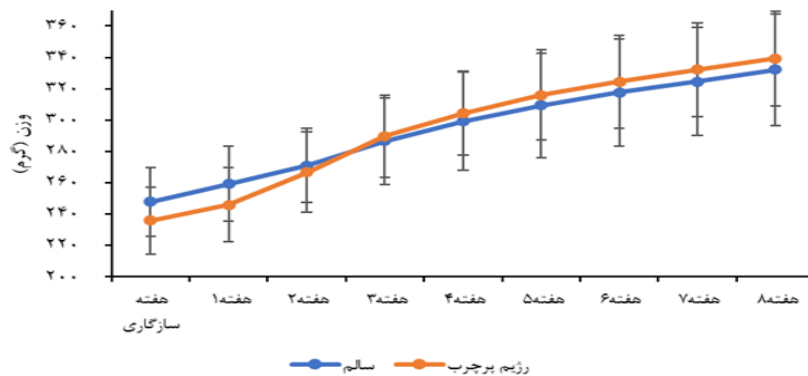
**رنگ‌آمیزی Oil red O:** بافت کبد که قبلاً در نیتروژن مایع خنک شده بود در ایزوپنتان (isopentane) غوطه‌ور شد و در دمای برش بهینه (OCT) (Fisher Tissue-Plus®) HealthCare™ قرار داده شد و متعاقباً برای تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی مورفولوژی کبد و محتوای چربی؛ ذخیره شد. نمونه‌های کبد بر روی یک کرایواستات (CM3050S, Nussloch, Leica Microsystems، ساخت کشور آلمان) به برش‌هایی به ضخامت پنج میکرومتر برش داده شدند. مقاطع کبد با Oil Red O (105230, Merck, Darmstadt, Germany) با یک میکروسکوپ نوری (Olympus, CX22، توکیو، ژاپن) مشاهده شد و از یک میدان تصادفی 40X از کبد هر حیوان با استفاده از نرم افزار Toup View (ToupTek Photonics، Zhejiang، چین) گرفته شد (۲۶). یک میدان میکروسکوپی نوری در هر بخش مشاهده شد و برای شدت استئاتوز کبدی، التهاب و فیبروز بر اساس معیارهای زیر نمره‌گذاری شد: برای استئاتوز کبدی: درجه صفر، بدون چربی. درجه یک، استئاتوز کمتر از ۳۳ درصد



به نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی و نمودار ۴ و ۵، در متغیرهای AST و ALT، در گروه کنترل-سالم نسبت به گروه‌های سالم-شنا (AST:  $P \leq 0/001$ )(ALT:  $P \leq 0/001$ )، بیمار-شنا (AST:  $P \leq 0/001$ )(ALT:  $P \leq 0/001$ ) و کنترل-بیمار (AST:  $P \leq 0/001$ )(ALT:  $P \leq 0/001$ ) کاهش معنی‌دار و گروه بیمار-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار کاهش معنی‌دار (AST:  $P \leq 0/001$ )(ALT:  $P \leq 0/001$ ) و گروه سالم-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار کاهش معنی‌دار (AST:  $P \leq 0/001$ )(ALT:  $P \leq 0/001$ ) وجود داشت ( $P \leq 0/05$ ).

بر اساس نمودار ۶، در متغیر GGT، افزایش معنی‌دار در گروه کنترل-بیمار نسبت به گروه کنترل-سالم ( $P \leq 0/001$ ) و کاهش معنی‌دار در گروه سالم-شنا نسبت به گروه بیمار-کنترل ( $P \leq 0/001$ ) و هم‌چنین کاهش معنی‌دار در گروه سالم-شنا نسبت به بیمار-شنا ( $P \leq 0/044$ ) وجود داشت.

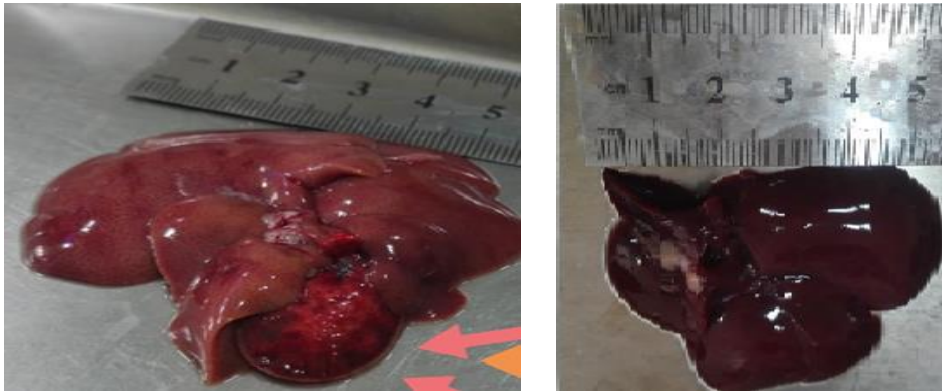
کنترل-سالم ( $P \leq 0/001$ )، کنترل-بیمار ( $P \leq 0/002$ ) و بیمار-شنا ( $P \leq 0/004$ ) افزایش معنی‌دار وجود دارد. با این وجود در گروه بیمار-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار افزایش غیر معنی‌داری ( $P \geq 0/9$ ) در این پروتئین بافتی کبد مشاهده شد. در شکل ۳، یافته‌های مربوط به اندازه‌گیری پروتئین PPAR- $\alpha$  از روش تکنیک وسترن بلات به صورت کیفی گزارش شده است. در این شکل از هر گروه آزمایش، سه نمونه بافت کبد انتخاب شد و اندازه‌گیری پروتئین PPAR- $\alpha$  نسبت به بتااکتین مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت. بزرگی اندازه پهنای تیرگی هر باند نسبت به بتااکتین نشان‌دهنده افزایش غلظت پروتئین یاد شده در نمونه‌های موردنظر است. بر اساس نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، می‌توان گفت تفاوت معنی‌داری بین میانگین متغیرهای ALT ( $F(3,28) = 87/509, P \leq 0/001$ )، AST ( $F(3,28) = 159/528, P \leq 0/001$ ) و GGT ( $F(3,28) = 11/167, P \leq 0/001$ ) در گروه‌های تحقیق وجود داشت. با توجه



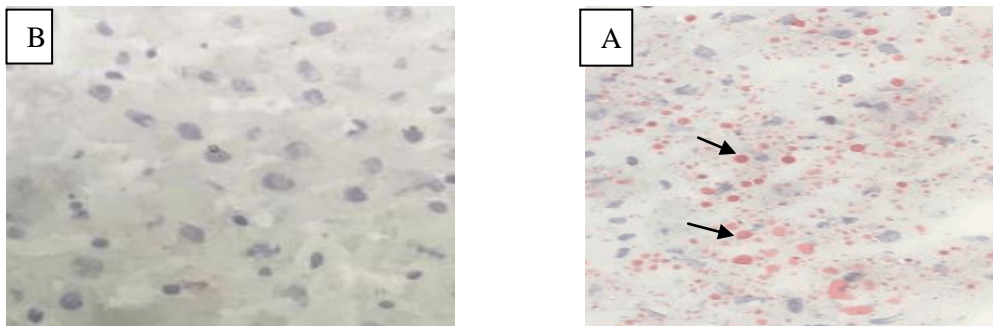
نمودار ۱: انحراف معیار  $\pm$  میانگین تغییرات وزن گروه‌های سالم و رژیم پرچرب در هشت هفته اول القا کبد چرب، در ابتدا یک هفته به‌عنوان سازگاری رت‌ها با محیط آزمایشگاه و رژیم غذایی در نظر گرفته شد.

جدول ۲: نتایج آزمایش بافتی و خونی جهت اثبات بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی

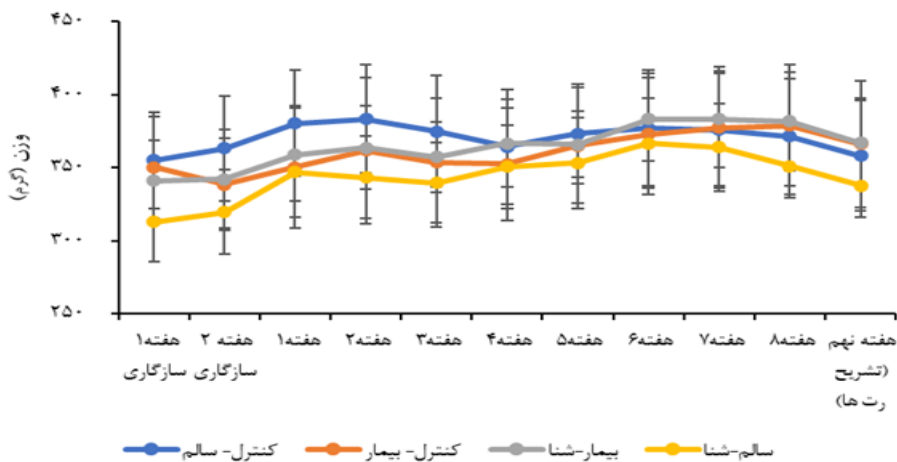
شماره رت	نمره استئاتوزیس	نمره التهاب	مرحله فیبروزیس	ALT	AST
۱ (بیمار)*	۲/۳۳	۰/۳	۲	۶۴/۵۴	۶۰/۹
۲ (بیمار)*	۲/۷۵	۰/۹	۲	۶۹/۷	۶۷/۸۴
۱ (سالم)	۰	۰	۰	۴۶/۳	۴۱/۲۱
۲ (سالم)	۰	۰	۰	۴۰/۳۹	۳۸/۴۱



شکل ۱: مقایسه نمای ظاهری کبد چرب (سمت راست) و کبد سالم (سمت چپ)، بلافاصله پس از کشتار در گروه بیمار و سالم

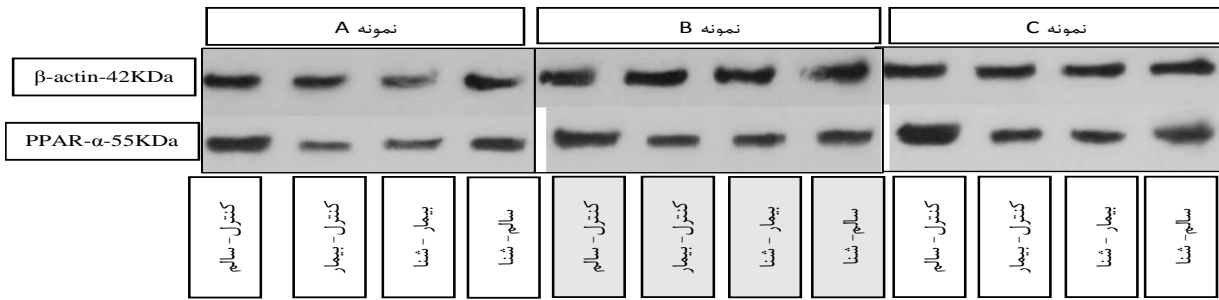


شکل ۲: رنگ آمیزی بافت کبد توسط Oil red O. A: کبد چرب، لیپیدها به رنگ قرمز درآمده‌اند. B: کبد سالم- به دلیل عدم وجود چربی هیچ نوع رنگ قرمزی به خود نگرفته است.

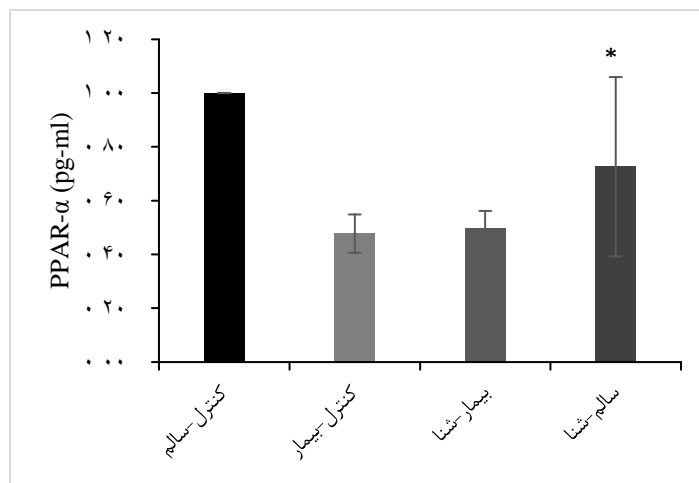


نمودار ۲: انحراف معیار  $\pm$  میانگین تغییرات وزن چهار گروه آزمایش در هشت هفته دوم پس از اثبات بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی، در ابتدا دو هفته به‌عنوان سازگاری رت‌ها با محیط تمرین در نظر گرفته شد و سپس از هفته‌های یک تا هشت تمرین اصلی مطابق پروتکل تمرینی انجام شد. هفته نهم، هفته تشریح رت‌ها بود.

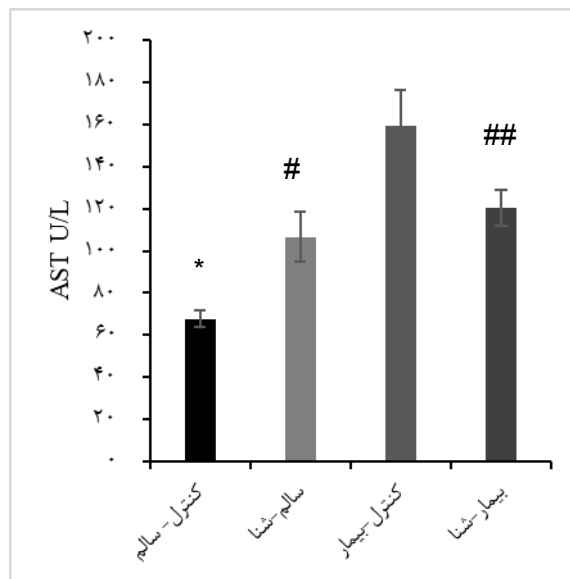




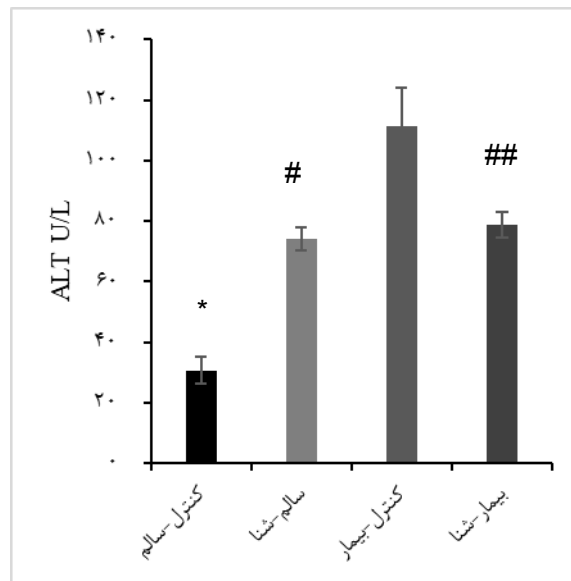
شکل ۳: مقایسه باندهای شکل گرفته پروتئین PPAR-α نسبت به بتاکتین در ۱۲ نمونه بافت کبد (از هر گروه آزمایش، سه نمونه انتخاب شدند) در روش وسترن بلات



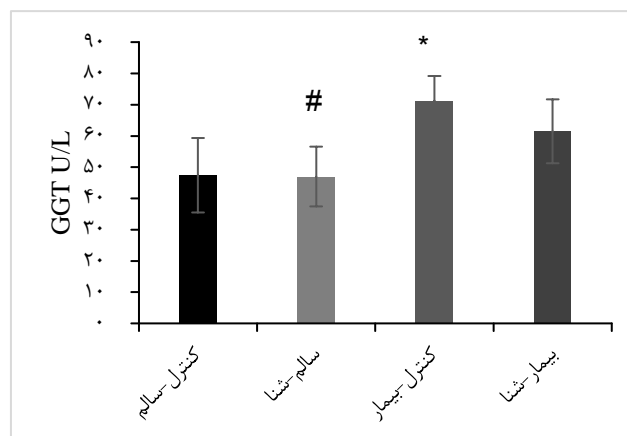
نمودار ۳: غلظت پروتئین PPAR-α در گروه‌های آزمایش. \*: افزایش معنی‌دار PPAR-α در گروه سالم-شنا نسبت به دو گروه بیمار-شنا و کنترل-بیمار ( $P \leq 0.05$ ). گروه کنترل-سالم به‌عنوان گروه کنترل، عدد یک در نظر گرفته شده است.



نمودار ۴: نتایج تحقیق در متغیر AST سرم، \*: کاهش معنی‌دار در گروه کنترل-سالم نسبت به گروه‌های سالم-شنا، کنترل-بیمار و بیمار-شنا ( $P \leq 0.01$ ), #: کاهش معنی‌دار در گروه سالم-شنا نسبت به کنترل-بیمار، ##: کاهش معنی‌دار گروه بیمار-شنا نسبت به کنترل-بیمار ( $P \leq 0.01$ ).



نمودار ۵: نتایج تحقیق در متغیر ALT سرم، #: کاهش معنی‌دار در گروه کنترل-سالم نسبت به گروه‌های سالم-شنا، کنترل-بیمار و بیمار-شنا ( $P \leq 0/001$ )، #: کاهش معنی‌دار در گروه سالم-شنا نسبت به کنترل-بیمار، ##: کاهش معنی‌دار در گروه بیمار-شنا نسبت به کنترل-بیمار ( $P \leq 0/001$ ).



نمودار ۶: نتایج تحقیق در متغیر GGT: #: افزایش معنی‌دار گروه کنترل-بیمار نسبت به کنترل-سالم ( $P \leq 0/001$ ), #: کاهش معنی‌دار در گروه سالم-شنا نسبت به بیمار-شنا ( $P \leq 0/044$ ) و کنترل-بیمار ( $P \leq 0/001$ )

PPAR- $\alpha$  بافت کبد، افزایش معنی‌دار این پروتئین در گروه سالم-شنا نسبت به گروه‌های بیمار-شنا و کنترل-بیمار مشاهده شد. همچنین در گروه بیمار-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار در میزان این پروتئین افزایش غیرمعنی‌دار بود. همسو با نتایج پژوهش حاضر می‌توان به Diniz و همکاران (۲۰۲۱) اشاره کرد. آن‌ها به دنبال ۱۲ هفته رژیم پرچرب در موش‌ها و هشت هفته فعالیت ورزشی هوازی روی تردمیل به این نتیجه رسیدند

## بحث

تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا بر پروتئین PPAR- $\alpha$  بافت کبد و آنزیم‌های کبدی در سرم خون موش‌های صحرائی نر مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) انجام شد. یافته‌ها نشان دادند که میانگین وزن در گروه سالم-شنا کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل-بیمار و سالم-شنا داشت. در پروتئین

پیروی از رژیم‌های غذایی دیگر (مانند رژیم‌های کتوژنیک و کم کالری) با رژیم غذایی پرچرب (HFD) تغذیه شدند (۳۳). Jinkyung Cho و همکاران (۲۰۱۴)، پس از ۱۵ هفته پیگیری HFD، اثرات هشت هفته تمرین ورزشی هوازی (دویدن روی تردمیل، پنج روز در هفته، هر جلسه ۵۵ دقیقه با شیب پنج درجه) را بر روی موش‌های C57BL/6 مبتلا به NAFLD مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که بیان  $PPAR\alpha$  کبدی به‌طور قابل‌توجهی در موش‌های HFD و رژیم غذایی پرچرب+ورزش (HFD+EX) در مقایسه با موش‌های معمولی کاهش یافت که از این نظر با نتایج مطالعه حاضر همسو است، با این حال موش‌های HFD + EX مقادیر قابل توجه بالاتری از بیان  $PPAR\alpha$  در مقایسه با موش‌های HFD داشتند که با نتایج مطالعه حاضر در تناقض است. دلایل تفاوت بین یافته‌های مطالعه آن‌ها و یافته‌های مطالعه حاضر ممکن است نوع تمرین (تمرینات تناوبی با شدت بالا در آب در برابر تمرینات هوازی تداومی بر روی تردمیل)، شدت تمرین (شدت بالا در برابر شدت متوسط)، حجم تمرین (سه روز در هفته و هر جلسه به مدت ۳۰ دقیقه در برابر پنج روز در هفته و هر جلسه به مدت ۵۵ دقیقه) و طول دوره NAFLD ناشی از HFD (۱۷ هفته در مقابل ۱۵ هفته) باشند (۳۲). فعال شدن  $PPAR\alpha$  در کبد منجر به افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد در فعالیت‌های میتوکندری، پراکسی‌زومی و میکروزومی و همچنین کاهش تجمع چربی کبدی در طول پیشرفت NAFLD می‌شود و از استئاتوز جلوگیری می‌کند (۳۴،۳۵). در همین حال، آزاد شدن کلسیم به‌دنبال انجام فعالیت ورزشی و انقباض عضلانی منجر به فعال شدن کالمودولین، کلسینورین و کالمودولین کیناز می‌شود و در عین حال بیان ژن  $SIRT1$  و  $PGC-1\alpha$  را افزایش می‌دهد. این پروتئین‌های بالادست منجر به فعال‌سازی  $PPAR\alpha$  می‌شوند و باعث افزایش اکسیداسیون لیپید و اسیدهای چرب موجود در میتوکندری و کاهش ذخیره چربی در کبد می‌شوند (۳۶،۳۷). موش‌هایی که روزانه ۴۰ دقیقه ورزش شنا کردند در مقایسه با موش‌های غیرفعال، بیان  $SIRT1$ ،  $PGC-1\alpha$  و  $AMPK$  بالاتری در عضله گاستروکمیوس داشتند. همچنین نشان داده شد که ورزش باعث افزایش محتوای  $SIRT1$ ،  $PGC-1\alpha$ ،

که فعالیت ورزشی هوازی باعث افزایش در سطح پروتئین  $PPAR\alpha$  می‌شود. همچنین رژیم غذایی پرچرب و افزایش استئاتوزیس کبدی، باعث کاهش معنی‌دار این پروتئین در گروه بیمار بی‌تحرك شد. آن‌ها این تغییرات را ناشی از افزایش مکانیسم سیگنال‌دهی  $AMPK-PPAR\alpha$  دانستند که بر اثرسازگاری با ورزش افزایش می‌یابد (۲۸). با انجام فعالیت ورزشی، میزان فعالیت  $AMPK$  بالا می‌رود.  $AMPK$  یک حسگر حالت انرژی درون سلولی است که با نسبت‌های بالای AMP به ATP (مثلاً در طول ناشتایی شبانه و یا در حالت فعالیت ورزشی) فعال می‌شود (۲۹). این عامل فعال شده چندین اثر مهم در بهبود استئاتوهپاتیت غیرالکلی دارد. از جمله می‌توان به فعال‌سازی پروتئین  $PPAR\alpha$  اشاره کرد و موجب افزایش غلظت آن پروتئین می‌شود.  $PPAR\alpha$  از راه افزایش بیان پروتئین‌های ناقل و آنزیم‌های تجزیه‌کننده اسیدهای چرب سبب افزایش و تنظیم متابولیسم می‌شود (۳۰). از سوی دیگر ناهمسو با نتایج تحقیق حاضر؛ در تحقیق Nikroo و همکاران (۲۰۲۰)، پروتئین‌های  $PPAR\alpha$  و  $SIRT1$  افزایش غیرمعنی‌دار در گروه ورزش نسبت به گروه کنترل داشتند (۳۱). این در حالی است که در تحقیق حاضر در گروه سالم-شنا پروتئین  $PPAR\alpha$  نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار داشت و از طرف دیگر در متغیر وزن، این گروه نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار دیده شد. بر اساس دیگر یافته‌های پژوهش حاضر، پس از هشت هفته فعالیت تناوبی شنا با شدت بالا افزایش غیرمعنی‌دار در سطح پروتئین  $PPAR\alpha$  در گروه بیمار-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار مشاهده شد. نتایج مربوط به پروتئین  $PPAR\alpha$  در این مطالعه تقریباً با یافته‌های ارائه شده در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۸)، Jinkyung Cho و همکاران (۲۰۱۴)، در تضاد بود (۳۲،۳۳). Zhang و همکاران (۲۰۱۸)، بیان کردند که به‌دنبال شش هفته تمرین هوازی با رژیم کتوژنیک؛ ژن‌های مصنوعی  $PPAR\alpha$  و  $PPAR\gamma$  و سطح لیپید کاهش می‌یابد و بیان ژن  $PPAR\alpha$  و بتااکسیداسیون لیپید افزایش می‌یابد. افزایش قابل توجه  $PPAR\alpha$  به این دلیل است که ورزش هوازی با رژیم کتوژنیک ترکیب شده بود. اما در این مطالعه تأثیر مستقل تمرینات ورزشی مورد بررسی قرار گرفت و موش‌ها تا پایان مطالعه بدون

به‌طور تصادفی موش‌های NAFLD ناشی از شش هفته HFD، به مدت هشت هفته تحت تمرینات تداومی و تناوبی قرار دادند. نتایج نشان داد که متغیرهای ALT و AST در گروه‌های تمرین+رزوراترول و تمرین ورزشی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار بی‌تحرك و سالم بی‌تحرك تجربه کردند. هم‌چنین کاهش وزن در گروه‌های تمرین و تمرین+مکمل نسبت به بیمار بی‌تحرك و سالم بی‌تحرك به‌طور معنی‌دار مشهود بود (۴۲). آلانین آمینوترانسفراز (ALT) که عمدتاً در کبد یافت می‌شود به‌عنوان شاخصی برای آسیب کبدی استفاده می‌گردد و در تحقیق حاضر در گروه بیمار-شنا نسبت به کنترل-بیمار کاهش معنی‌دار داشت. این یافته نشان می‌دهد که علیرغم عدم محدودیت کالریک‌الگوی، شدت و مدت پروتکل ورزشی به کبد که منبع اصلی ALT است؛ نه‌تنها آسیبی وارد نکرده است بلکه در شرایط بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی باعث بهبود آن شده است. در این راستا می‌توان به نتایج تحقیقات Davries و همکاران (۲۰۰۸) و Sreenivasa و همکاران (۲۰۰۶) و Nuri و همکاران (۲۰۱۲) اشاره کرد (۴۵-۴۳). میکائیل و همکاران (۲۰۱۲)، تاثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی را بر شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیم‌های ALT و GGT کبد در زنان و مردان مبتلا به NAFLD بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند علی‌رغم کاهش معنی‌دار وزن آزمودنی‌ها پس از دوره تمرین تفاوت معنی‌دار در آنزیم ALT مشاهده نشد؛ اما کاهش معنی‌دار در آنزیم GGT در گروه مردان یافت شد. این در حالی است که در تحقیق حاضر نیز گروه سالم-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار در متغیر GGT کاهش معنی‌داری تجربه کرد اما در گروه بیمار-شنا نسبت به کنترل-بیمار کاهش غیرمعنی‌دار مشاهده شد. از جمله دلایل این عدم معنی‌داری را می‌توان به تداوم رژیم پرچرب ۷۷ درصد تا پایان دوره تحقیق برای گروه بیمار-شنا و کنترل-بیمار اشاره کرد. این نتیجه بیان می‌کند که با وجود عدم محدودیت کالریک؛ تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا می‌توانند بر کاهش آنزیم GGT به‌عنوان یک نشانگر بیماری کبد چرب تاثیر داشته باشند. Uadia و همکاران (۲۰۱۶)، به بررسی تأثیر فعالیت بدنی و انعطاف‌پذیری بر سطوح پلاسمایی برخی آنزیم‌های کبدی در جوان نیجریه‌ای پرداختند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که نسبت به قبل از دوره

AMPK و پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) می‌شود (۳۷). هم‌چنین نشان داده شده است که PPAR- $\alpha$  منجر به کاهش ApoC3 می‌گردد و هیدرولیز LDL را مهار می‌کند و منجر به کاهش لیپیدها به واسطه فعالیت لیگاندهای PPAR- $\alpha$  می‌گردد (۳۸). علاوه بر این، PPAR- $\alpha$  از پیشرفت استئاتوز ساده به سمت NASH جلوگیری می‌کند. هم‌چنین پروتئین‌های التهابی را عمدتاً از طریق فعالیت ضدالتهابی قوی در کبد و مهار بیان ژن عوامل التهابی تنظیم می‌کند (۳۹). در متغیرهای ALT و AST، بین گروه کنترل-سالم با گروه‌های کنترل-بیمار، بیمار-شنا و سالم-شنا کاهش معنی‌دار و هم‌چنین بین گروه‌های بیمار-شنا و سالم-شنا با گروه کنترل-بیمار کاهش معنی‌دار مشاهده شد. در متغیر GGT، گروه کنترل-بیمار نسبت به گروه کنترل-سالم افزایش معنی‌دار و گروه سالم-شنا نسبت به کنترل-بیمار و هم‌چنین گروه سالم-شنا نسبت به بیمار-شنا کاهش معنی‌دار داشت. با این حال در این متغیر گروه بیمار-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار کاهش غیرمعنی‌دار مشاهده شد. همسو با نتایج تحقیق حاضر می‌توان به پژوهش Batatinha و همکاران (۲۰۱۷) اشاره کرد. آن‌ها به‌دنبال هشت هفته فعالیت ورزشی هوازی بر موش‌های C57BL6 القا شده به NAFLD توسط رژیم غذایی پرچرب، کاهش معنی‌دار آنزیم AST را در گروه بیمار-تمرین نسبت به گروه بیمار بی‌تحرك نتیجه گرفتند (۴۰). Nikroo و همکاران (۲۰۲۰)، پس از ۱۲ هفته القا بیماری استئاتوزیس از طریق رژیم غذایی پرچرب، به این نتیجه رسیدند که فعالیت ورزشی باعث کنترل وزن می‌شود. هم‌چنین ورزش باعث کاهش معنی‌دار ALT و AST سرم نسبت به گروه کنترل در موش‌های صحرائی تحقیق آن‌ها شد (۳۱). Liu و همکاران (۲۰۱۹)، مکانیسم اساسی تمرین هوازی با شدت متوسط (صفر درجه شیب، ۵/۲ متر در دقیقه، یک ساعت در روز و پنج روز در هفته برای مجموع هشت هفته) روی بافت‌های کلیه و کبد در موش‌های دیابتی db/db مورد بررسی قرار دادند. در پایان دوره تمرین به این نتیجه رسیدند که متغیرهای ALT و AST در گروه تمرین نسبت به بیمار بی‌تحرك کاهش معنی‌دار یافته‌اند. هم‌چنین فعالیت ورزشی باعث کاهش وزن در گروه ورزش شده بود (۴۱). Hajighasem و همکاران (۲۰۱۸)،

مطالعات بیشتری نیز برای کشف مسیرهای مولکولی و مکانیسم‌های درگیر مورد نیاز است.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر بر روی موش‌های صحرایی ناشی از بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی ناشی از مصرف رژیم غذایی پرچرب نشان داد که هشت هفته تمرینات شنای تناوبی با شدت بالا در گروه بیمار-شنا نسبت به کنترل-بیمار علیرغم عدم تفاوت معنی‌دار در وزن این دو گروه باعث کاهش معنی‌دار در آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و GGT) که به‌عنوان نشانگرهای عمومی بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی می‌شوند، شد با این وجود منجر به کاهش غیرمعنی‌دار پروتئین PPAR $\alpha$  گشت. این نتایج نشان می‌دهد علیرغم عدم محدودیت کالریک، این مدل تمرینات مستقل از کاهش وزن می‌تواند علائم عمومی بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی از جمله آنزیم‌های کبدی را کاهش دهد با این حال تأثیر قابل‌توجهی بر پروتئین PPAR $\alpha$  نداشت و پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی مدت پروتکل تمرین و یا شدت آن و یا هر دو را افزایش داد. از طرف دیگر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا موجب کاهش معنی‌دار وزن آنزیم‌های کبدی در گروه سالم-شنا نسبت به گروه‌های کنترل-سالم و کنترل-بیمار شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که این مدل تمرین در آزمودنی‌های سالم نیز بسیار اثرگذار است و می‌تواند باعث جلوگیری از ابتلا به بیماری‌های متابولیکی از جمله کبد چرب نسبت به افراد بی‌تحرک شود. هم‌چنین در پروتئین PPAR $\alpha$  نیز افزایش معنی‌دار در گروه سالم-شنا نسبت به بیمار-شنا و کنترل-بیمار نشان می‌دهد که این مدل تمرین می‌تواند پویایی و فعالیت متابولیسم لیپید را بسیار تحت تأثیر مثبت قرار دهد و موجب جلوگیری فرد از ابتلا به بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی شود.

### سپاس‌گزاری

از تمامی کسانی که ما را در اجرای این پایان‌نامه دکتری یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

حامی مالی: دانشگاه شیراز

تعارض در منافع: وجود ندارد.

تمرین متغیر AST افزایش معنی‌دار و متغیرهای ALT و GGT عدم معنی‌داری را از خود نشان دادند. از جمله دلایل تناقض یافته‌های تحقیق آن‌ها با یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان به نوع آزمودنی‌ها (موش‌های صحرایی مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی ناشی از رژیم پرچرب در برابر آزمودنی‌های سالم و جوان)، نوع پروتکل تمرینی (فعالیت تناوبی شنا با شدت بالا در برابر فعالیت بدنی با شدت کم) و مدت پروتکل تمرینی (هشت هفته در برابر شش هفته) اشاره کرد (۱۷). این درحالی است که در تحقیق حاضر گروه بیمار-شنا نسبت به گروه کنترل-بیمار کاهش معنی‌دار در آنزیم‌های GGT، ALT و AST داشت. این یافته نشان می‌دهد با وجود عدم محدودیت کالریک و مصرف دائم رژیم پرچرب، به واسطه انجام فعالیت ورزشی تناوبی شنا با شدت بالا از افزایش آنزیم‌های کبد جلوگیری و حتی باعث کاهش آن‌ها در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی شد. در مطالعه حاضر کاهش وزن، کاهش سطوح آمینوترانسفراز سرم و هم‌چنین تغییرات افزایشی غلظت پروتئین PPAR- $\alpha$  در گروه سالم-شنا نسبت به سایر گروه‌ها پس از هشت هفته شنای تناوبی با شدت بالا معنی‌دار بود؛ اما در گروه بیمار-شنا نسبت به کنترل-بیمار کاهش آمینوترانسفراز سرم کاهش معنی‌دار و غلظت پروتئین PPAR- $\alpha$  افزایش غیرمعنی‌دار داشت. یکی از دلایل اصلی نتایج به‌دست آمده به این خاطر است که در تحقیق حاضر رژیم غذایی پرچرب تا پایان تمرینات بدون محدودیت کالریک برای گروه‌های بیمار-شنا و کنترل-بیمار ادامه داشت تا تنها تأثیر ورزش شنای تناوبی با شدت بالا بر سطح پروتئین PPAR- $\alpha$  کبدی در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی مورد سنجش قرار گیرد. با این حال این مدل تمرین با وجود عدم محدودیت کالریک بر کاهش معنی‌دار آنزیم‌های موثر کبدی (ALT، AST و GGT) در گروه‌های تمرین سالم-شنا نسبت به کنترل-بیمار موثر بوده و کنترل-سالم و بیمار-شنا نسبت به کنترل-بیمار موثر بوده است. به نظر می‌رسد با افزایش حجم نمونه و مدت زمان تمرین، تغییرات قابل‌توجهی در پروتئین PPAR $\alpha$  نیز رخ دهد و منجر به بهبود بیشتر بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی ناشی از مصرف رژیم پرچرب شود. هم‌چنین،

## References:

- 1-Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. *Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic, and Clinical Implications*. J Hepatol 2010; 51(2): 679-89.
- 2-Fan JG, Farrell GC. *Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in China*. J Hepatol 2009; 50(1): 204-10.
- 3-Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. *Swimming Training Beneficial Effects in a Mice Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Exp Toxicol Pathol 2010; 64(4): 273-82.
- 4-Steensels S, Qiao J, Ersoy BA. *Transcriptional Regulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Metabolites 2020; 10(7): 283.
- 5-Souza-Mello V. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Targets to Treat Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. WJH 2015; 7(8): 1012.
- 6-Kersten S, Stienstra R. *The Role and Regulation of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha in Human Liver*. J Biochem 2017; 136: 75-84.
- 7-Lee S, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, et al. *Targeted Disruption of the Alpha Isoform of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gene in Mice Results in Abolishment of the Pleiotropic Effects of Peroxisome Proliferators*. J Mol Cell Biol 1995; 15(6): 3012-22.
- 8-Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. *Ppara Gene Expression Correlates with Severity and Histological Treatment Response in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis*. J Hepatol 2015; 63(1): 164-73.
- 9-Zhang H, He Y, Chung PK, Tong TK, Fu FH, Chen Y, et al. *Effects of 12 Weeks of Exercise on Hepatic TNF- $\alpha$  and Ppara in an Animal Model of High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis*. JESF 2009; 7(1): 18-23.
- 10-Oh S, So R, Shida T, Matsuo T, Kim B, Akiyama K, et al. *High-Intensity Aerobic Exercise Improves both Hepatic Fat Content and Stiffness in Sedentary Obese Men with Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Sci Rep 2017; 7: 43029.
- 11-Patel NS, Doycheva I, Peterson MR, Hooker J, Kisselva T, Schnabl B, et al. *Effect of Weight Loss on Magnetic Resonance Imaging Estimation of Liver Fat and Volume in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis*. Clin Gastroenterol Hepatol 2015; 13(3): 561-8.
- 12-Hallsworth K, Adams LA. *Lifestyle Modification in NAFLD/NASH: Facts and Figures*. JHEP Rep 2019; 1(6): 468-79.
- 13-Hamasaki H. *Perspectives on Interval Exercise Interventions for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. J Med 2019; 6(3): 83.
- 14-Abdelbasset WK, Tantawy SA, Kamel DM, Alqahtani BA, Soliman GS. *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*. J Med 2019; 98(12): e14918.
- 15-Winn NC, Liu Y, Rector RS, Parks EJ, Ibdah JA, Kanaley JA. *Energy-Matched Moderate and High*



- Intensity Exercise Training Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease Risk Independent of Changes in Body Mass or Abdominal Adiposity—A Randomized Trial.* Metabolism 2018; 78: 128-40.
- 16-Houghton D, Thoma C, Hallsworth K, Cassidy S, Hardy T, Burt AD, et al. *Exercise Reduces Liver Lipids and Visceral Adiposity in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis in a Randomized Controlled Trial.* Clin Gastroenterol Hepatol 2017; 15(1): 96-102.
- 17-Uadia P, Orumwensodia K, Arainru G, Agwubike E, Akpata C. *Effect of Physical and Flexibility Exercise on Plasma Levels of Some Liver Enzymes and Biomolecules of Young Nigerian Adults.* Trop J Pharm Res 2016; 15(2): 421-5.
- 18-Nagle EF, Sanders ME, Franklin BA. *Aquatic High Intensity Interval Training for Cardiometabolic Health: Benefits and Training Design.* Am J Lifestyle Med 2017; 11(1): 64-76.
- 19-Igarashi Y, Nogami Y. *Response of Lipids and Lipoproteins to Regular Aquatic Endurance Exercise: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.* JAT 2019; 26(1): 14-30.
- 20-Kasprzak Z, Pilaczyńska-Szcześniak Ł. *Effects of Regular Physical Exercises in the Water on the Metabolic Profile of Women with Abdominal Obesity.* J Hum Kinet 2014; 41(1): 71-9.
- 21-Kurobe K, Kousaka A, Ogita F, Matsumoto N. *Metabolic Responses to Exercise on Land and in Water Following Glucose Ingestion.* Clin Physiol Funct 2018; 38(2): 227-32.
- 22-Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. *High-Fat Emulsion-Induced Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis.* Life Sci 2006; 79(11): 1100-7.
- 23-Farzanegi P, Habibian M, Alinejad H. *The Combined Effect of Regular Aerobic Exercise with Garlic Extract on Renal Apoptosis Regulatory Factors in Aged Rats with Chronic Kidney Disease.* AMUJ 2016; 19(3): 62-70. [Persian]
- 24-Ramos-Filho D, Chicaybam G, de-Souza-Ferreira E, Guerra Martinez C, Kurtenbach E, Casimiro-Lopes G, et al. *High Intensity Interval Training (HIIT) Induces Specific Changes in Respiration and Electron Leakage in the Mitochondria of Different Rat Skeletal Muscles.* PloS one 2015; 10(6): e0131766.
- 25-Shafiee A, Gaeini A, Soleimani M, Nekouei A, Hadidi V. *The Effect of Eight Week of High Intensity Interval Training on Expression of Mir-210 and Ephrina3 Mrna in Soleus Muscle Healthy Male Rats.* AMUJ 2014; 17(3): 26-34. [Persian]
- 26-Chen B, Ma Y, Xue X, Wei J, Hu G, Lin Y. *Tetramethylpyrazine Reduces Inflammation in the Livers of Mice Fed a High Fat Diet.* Mol Med Rep 2019; 19(4): 2561-8.
- 27-Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. *Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease.* J Hepatol 2005; 41(6): 1313-21.
- 28-Diniz TA, de Lima Junior EA, Teixeira AA, Biondo LA, da Rocha LAF, Valadão IC, et al.

- Aerobic Training Improves NAFLD Markers And Insulin Resistance Through AMPK-PPAR-A Signaling In Obese Mice.* Life Sci 2021; 266: 118868.
- 29-Ren L, Sun D, Zhou X, Yang Y, Huang X, Li Y, et al. *Chronic Treatment with the Modified Longdan Xiegan Tang Attenuates Olanzapine-Induced Fatty Liver in Rats by Regulating Hepatic De Novo Lipogenesis and Fatty Acid Beta-Oxidation-Associated Gene Expression Mediated by SREBP-1c, PPAR-Alpha and AMPK-Alpha.* J Ethnopharmacol 2019; 232: 176-87.
- 30-Sozio MS, Liangpunsakul S, Crabb D, editors. *The Role of Lipid Metabolism in the Pathogenesis of Alcoholic and Nonalcoholic Hepatic Steatosis.* Semin Liver Dis 2010; 30(4): 378-90.
- 31-Nikroo H, Hosseini SRA, Fathi M, Sardar MA, Khazaei M. *The Effect of Aerobic, Resistance, and Combined Training on PPAR-A, SIRT1 Gene Expression, and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced NAFLD Male Rats.* Physiol Behav 2020; 227: 113149.
- 32-Cho J, Lee I, Kim D, Koh Y, Kong J, Lee S, et al. *Effect of Aerobic Exercise Training on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Induced by a High Fat Diet in C57BL/6 Mice.* J Nutr Biochem 2014; 18(4): 339-46.
- 33-Zhang Q, Xu L, Xia J, Wang D, Qian M, Ding S. *Treatment of Diabetic Mice with a Combination of Ketogenic Diet and Aerobic Exercise Via Modulations of Ppars Gene Programs.* PPAR Res 2018; 32(5): 245-56.
- 34-Mandard S, Müller M, Kersten S. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor A Target Genes.* Cell Mol Life Sci 2004; 61(4): 393-416.
- 35-Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. *Administration of the Potent Ppara Agonist, Wy-14,643, Reverses Nutritional Fibrosis and Steatohepatitis in Mice.* J Hepatol 2004; 39(5): 1286-96.
- 36-Radak Z, Koltai E, Taylor AW, Higuchi M, Kumagai S, Ohno H, et al. *Redox-Regulating Sirtuins In Aging, Caloric Restriction, And Exercise.* Free Radic Biol Med 2013; 58: 87-97.
- 37-Huang CC, Wang T, Tung YT, Lin WT. *Effect of Exercise Training on Skeletal Muscle SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  Expression Levels in Rats of Different Age.* Int J Med Sci 2016; 13(4): 260-70.
- 38-Contreras AV, Torres N, Tovar AR. *PPAR-A as a Key Nutritional and Environmental Sensor For Metabolic Adaptation.* Adv Nutr 2013; 4(4): 439-52.
- 39-Gregoire F, Kersten S, Harrington W. *PPARS and Obesity.* PPAR Res 2007; 2007: 78475.
- 40-Batatinha HAP, Lima EA, Teixeira AAS, Souza CO, Biondo LA, Silveira LS, et al. *Association between Aerobic Exercise and Rosiglitazone Avoided the NAFLD and Liver Inflammation Exacerbated in PPAR- $\alpha$  Knockout Mice.* J Cell Physiol 2017; 232(5): 1008-19.
- 41-Liu HW, Kao HH, Wu CH. *Exercise Training Upregulates SIRT1 to Attenuate Inflammation and Metabolic Dysfunction in Kidney and Liver of Diabetic Db/Db Mice.* Nutr Metab 2019; 16(1):22.

- 42-Hajjighasem A, Farzanegi P, Mazaheri Z, Naghizadeh M, Salehi G. *Effects of Resveratrol, Exercises and their Combination on Farnesoid X Receptor, Liver X Receptor and Sirtuin 1 Gene Expression and Apoptosis in the Liver of Elderly Rats With Nonalcoholic Fatty Liver*. Peer J 2018; 6: e5522.
- 43-Devries MC, Samjoo IA, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. *Effect of Endurance Exercise on Hepatic Lipid Content, Enzymes, and Adiposity in Men and Women*. J Obes 2008; 16(10): 2281-8.
- 44-Baba CS, Alexander G, Kalyani B, Pandey R, Rastogi S, Pandey A, et al. *Effect of Exercise and Dietary Modification on Serum Aminotransferase Levels in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis*. JGH 2006; 21(1): 191-8.
- 45-Nuri R, Mahmudieh B, Akochakian M, Moghaddasi M. *Effect of 15 Weeks Combination Exercise Training on Lipid Profile and Fatty Liver Indices in Postmenopausal Women with Breast Cancer*. Braz J Biomotricity 2012; 6(4): 297-303.

## Effect of High-intensity Intermittent Swimming Training on peroxisome proliferator-activated receptors- $\alpha$ and Liver Enzymes in Non-alcoholic Steatohepatitis Male Rats

Alireza Jowhari<sup>1</sup>, Farhad Daryanoosh<sup>\*1</sup>, Maryam Koushkie Jahromi<sup>1</sup>, Ali Akbar Nekooeian<sup>2</sup>

### Original Article

**Introduction:** Accumulation of fat in the liver tissue is known as the most important cause of non-alcoholic steatohepatitis, which is associated with a decrease in the protein of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- $\alpha$ ). This study aimed to investigate the effect of eight weeks of high-intensity interval training (HIST) on PPAR- $\alpha$  and liver enzymes in high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis rats.

**Methods:** The current research was semi-experimental. 40 Sprague-Dawley male rats (age: 6 to 8 weeks and weight:  $230 \pm 20$  grams) were selected and divided into two equal groups, healthy and high-fat diet (HFD). The HFD group was subjected to gavage for eight weeks with the aim of inducing the disease. Rats were divided into four groups: control-healthy (n=9), healthy-swimming (n=9), control-disease (n=9) and disease-swimming (n=9). The training groups performed HIST for eight weeks (three sessions per week, each session lasting 30 minutes). In the end, liver PPAR- $\alpha$  was measured by western blot analysis; and ALT, AST and GGT enzymes in serum level were measured by photometric method. One-way analysis of variance and Bonferroni's post hoc test were used to analyze the data. Significant level ( $P \geq 0.05$ ) and all statistical methods were performed using SPSS16 software.

**Results:** HIST controlled the weight gain caused by HFD and there was a significant decrease in serum ALT and AST in the healthy-swimming and sick-swimming groups compared to the control-patient group and a significant decrease in serum GGT in the healthy-swimming group compared to the control-patient ( $P \leq 0.001$ ) and patient-swimming ( $P \leq 0.044$ ) were observed. A significant increase in hepatic PPAR- $\alpha$  was observed in healthy-swimming patients compared to the control-patients ( $P \leq 0.002$ ).

**Conclusion:** HIST can control body weight and reduce liver enzymes. However, more research is needed to obtain definitive results.

**Keywords:** Non-alcoholic Steatohepatitis, High-intensity Interval Swimming, Hepatic peroxisome proliferator activator protein, Liver enzymes.

**Citation:** Jowhari A, Daryanoosh F, Koushkie Jahromi M, Nekooeian A.A. **Effect of High-intensity Intermittent Swimming Training on peroxisome proliferator-activated receptors- $\alpha$  and Liver Enzymes in Non-alcoholic Steatohepatitis Male Rats** . J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2023; 30(10): 6034-51.

<sup>1</sup>Faculty of Educational Sciences and Psychology, Department of Sports Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 09173014032, email: daryanoosh@shirazu.ac.ir