



## تأثیر عصاره انگور قرمز و تمرینات هوازی بر سطوح سرمی اکتیوین-A و TGF- $\beta$ در رت‌های مبتلا به بیماری کبد چرب غیر الکلی

فائمه دهقانپور: دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران  
علیرضا براری: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران (\* نویسنده مسئول) [alireza54.barari@gmail.com](mailto:alireza54.barari@gmail.com)  
احمد عبدی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران  
پروین فرزانیگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

### چکیده

**کلیدواژه‌ها**  
عصاره انگور قرمز،  
تمرینات هوازی،  
اکتیوین-A،  
TGF- $\beta$ ،  
بیماری کبد چرب غیر الکلی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۹

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹

**زمینه و هدف:** بیماری کبد چرب غیرالکلی (NFALD) یکی از علت‌های اصلی عملکرد غیرنرمال کبد می‌باشد که می‌تواند منجر به نکرز و آپوپتوز شود؛ بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر عصاره انگور قرمز و تمرینات هوازی بر سطوح سرمی اکتیوین-A و TGF- $\beta$  در رت‌های مبتلا به بیماری کبد چرب غیر الکلی باشد.  
**روش کار:** در این پژوهش تجربی ۵۶ سر رت نر ویستار به صورت تصادفی به گروه سالم و گروه تجربی کبد چرب تقسیم شدند. رت‌ها در گروه تجربی روزانه رزوراترول را به میزان ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت می‌کردند. برنامه تمرین شامل ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته بود. از روش آنالیز واریانس یک‌راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد.  
**یافته‌ها:** کبد چرب موجب افزایش سطوح سرمی اکتیوین-A و TGF- $\beta$  در گروه بیمار شد و همچنین تمرین هوازی و عصاره انگور قرمز (رزوراترول) موجب کاهش معنادار سطح سرمی اکتیوین-A و TGF- $\beta$  در رت‌های مسن مبتلا به NFALD در گروه‌های تجربی شد.  
**نتیجه‌گیری:** یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که سطوح سرمی TGF- $\beta$  و اکتیوین A در رت‌های مبتلا به NFALD افزایش یافته است؛ این احتمال وجود دارد که دلیل افزایش سطوح سایتوکاین‌ها احتمالاً به خود فرآیند سیروز مربوط باشد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Dehghanipour F, Barari A, Abdi A, Farzanegi P. The Effect of Resveratrol Supplementation and Aerobic Exercise on Serum Levels of Activin A and TGF- $\beta$  in Rats with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Razi J Med Sci. 2022;29(9):41-51.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## The Effect of Resveratrol Supplementation and Aerobic Exercise on Serum Levels of Activin A and TGF- $\beta$ in Rats with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

**Faeghe Dehghanipour:** Department of Sport Physiology(PhDCandidate), Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad, University, Amol, Iran

**Alireza Barari:** PhD, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad, University, Amol, Iran (\*Corresponding author) [alireza54.barari@gmail.com](mailto:alireza54.barari@gmail.com)

**Ahmad Abdi:** Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad, University, Amol, Iran

**Parvin Farzanegi:** Department of Sport Physiology, sari, Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is one of the main causes of abnormal liver function, and the prevalence of this disease is reported to be around 20% in the world (1). NAFLD is often associated with obesity, dyslipidemia, and insulin resistance in metabolic syndrome (2). NAFLD includes the accumulation of triglycerides, necrosis, and apoptosis in fat cells, which are associated with inflammatory responses in the liver. In total, these cases increase the possibility of liver cirrhosis (4). The large family of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) together with TGF- $\beta$ 1 and activin-A is a part of bone morphogenic proteins and is considered a multipurpose cytokine in a wide range of tissues and cells. These factors play a role in cell differentiation, cell number homeostasis and tissue repair, inflammation, cell proliferation, and apoptosis (5). Activin-A increases the expression of collagen and TGF- $\beta$ 1. It causes mitochondrial  $\beta$ -oxidation and downregulation of fatty acid synthase activity. In addition, activin-A inhibits proliferation and stimulates apoptosis of liver cells, which helps complete liver regeneration; Hepatocyte proliferation and liver regeneration are controlled by activin-A (7). Today, for the management of NAFLD, lifestyle modification techniques through changes in diet and physical activity are considered. Physical activity, including aerobic, resistance, and interval, reduces NAFLD disease by regulating intrahepatic fat status, reducing oxidative stress and inflammation, apoptosis, and autophagy process (8). There are various medicinal agents for the treatment of various diseases. The combination of using herbal medicines and engaging in physical activity has attracted the attention of researchers. Among these substances is resveratrol, which is found in purple and red plants, especially in the skin of red grapes and the berry family (9). Resveratrol has antioxidant, anti-cancer, and anti-inflammatory uses, and was first extracted from an Asian plant called *Polygonum capsidatum* (10). Resveratrol has inherent protective properties to prevent the spread of disease. Its anti-inflammatory effect has been determined by reducing pro-inflammatory cytokines and preventing the production of nitric oxide in macrophages. Resveratrol also regulates lipid metabolism and prevents lipid oxidation and platelet aggregation (11).

**Methods:** In this experimental study, 56 old male Wistar rats with an age of 40-50 weeks and an average weight of 250-300 grams were selected. At first, the rats were divided into two groups: control and NAFLD patients. The rats in the control group were fed a standard diet (including 12% fat, 57% carbohydrates, 28% protein, and 3% other items) for 6 weeks. To induce NAFLD, rats in the experimental group were subjected to a high-fat diet (including 22% fat, 50% carbohydrate, 24% protein, and 4% other items) for 6 weeks. Then, the rats of the patient group with NAFLD were divided into 7 groups, and each group included 7 rats. Seven groups include (1) patient group, (2) group receiving saline, (3) group receiving resveratrol supplement, (4) continuous training group, (5) intermittent training group, (6) continuous training-resveratrol group, and (7) intermittent training-resveratrol group. The rats in the training group and the supplement+training group were familiarized with the treadmill for 5 minutes at a speed of 8-10 m/min with zero inclines for one week during 5 sessions. The

### Keywords

Resveratrol  
Supplementation,  
Aerobic Training,  
Activin-A,  
TGF- $\beta$ ,  
Non-Alcoholic Fatty  
Liver

Received: 10/09/2022

Published: 10/12/2022

main continuous training program was carried out for 8 weeks and 5 sessions per week, in the first week, the speed was 15 meters per minute and the time was 5 minutes. Every week, the speed increased by 1-2 meters per minute and the time increased by 1-2 minutes. In the eighth week, the speed reached 20 meters per minute and the time was 60 minutes (12). The interval training program started in the first week with a speed of 10 meters per minute and a time of 10-15 minutes with a zero-degree slope. In the following weeks, training consisted of 10 minutes daily (2:30 x 4) at a speed of 50 m/min and a 10-degree incline with periods of 2:30 minutes (more than 90% of maximal oxygen consumption), separated by 3-minute rest periods. The number of sessions was 5 sessions per week (13). In the supplement and supplement+training groups, they were injected intraperitoneally with a dose of 20 mg per kilogram of body weight. After completing the research period, all rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine 48 hours after the last training session. Liver samples were kept at -80 C. Serum activin-A and TGF- $\beta$  levels were measured using a kit and ELISA method. The Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of data distribution. If the data were normal, one-way variance analysis and Tukey's post hoc statistical tests were used. The significance level for all calculations was considered  $p \geq 0.05$ . All statistical operations were performed using SPSS version 20 software.

**Results:** Data analysis shows that there is a significant difference in the mean and standard deviation of TGF- $\beta$  and activin-A serum levels between different groups ( $P=0.0001$ ). It was also observed that aerobic training and red grape extract (resveratrol) have a significant effect on the serum levels of TGF- $\beta$  and activin-A in elderly rats with NAFLD in different groups ( $P=0.0001$ ).

**Conclusion:** The findings of the present research showed that the lowest serum levels of activin-A were observed in the resveratrol+continuous training group and the highest levels were observed in the patient and saline groups. Fatty liver increased activin-A levels in the patient group, and aerobic training and red grape extract (resveratrol) significantly decreased serum activin-A levels in elderly rats with NAFLD in the resveratrol+continuous training group; Of course, in the supplement group, continuous training and interval training+resveratrol also had a decreasing trend, but it did not reach a significant level. NAFLD appears to result from an imbalance between hepatic fatty acid synthesis and oxidation (5). Our findings suggest that NAFLD should be added to the list of liver disorders that could be activin-A-mediated mechanisms. Previously, activin-A was reported to inhibit liver growth by inhibiting hepatic proliferation and inducing apoptosis, as well as by inducing extracellular matrix production during liver fibrosis (14). The results of the present study showed that the levels of TGF- $\beta$  increased in the high-fat food consumption group; while training and resveratrol supplementation decreased the level of TGF- $\beta$  in the experimental groups. Studies have shown that the TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway may play an important role in activating HSCs and regulating the production, degradation, and accumulation of ECM proteins (19). Therefore, inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway can be an attractive therapeutic target for the prevention of liver fibrosis (20).

Finally, the findings of the current research showed that the serum levels of TGF- $\beta$  and activin-A increased in rats with NAFLD. The reason for the increased levels of cytokines may be related to the cirrhosis process itself. In previous research, it has been shown that poor liver function leads to cirrhosis secondarily and disrupts the metabolism of TGF- $\beta$  and causes the accumulation of this multifunctional cytokine in the body.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Dehghanipour F, Barari A, Abdi A, Farzanegi P. The Effect of Resveratrol Supplementation and Aerobic Exercise on Serum Levels of Activin A and TGF- $\beta$  in Rats with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Razi J Med Sci. 2022;29(9):41-51.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD یکی از علت‌های اصلی عملکرد غیرنرمال کبد می‌باشد که شیوع این بیماری در حدود ۲۰ درصد در دنیا گزارش شده است (۱). از نظر بافت‌شناسی، بیماری NAFLD طیفی از بیماری است و در دامنه رسوب چربی ساده (استاتوز ساده) تا التهاب ناشی از تجمع چربی که به سیروز کبدی شکل پیشرفته بیماری است، منتهی می‌شود. اگرچه استاتوز غیرالکلی به خطر پیش‌رونده بیماری کبد اشاره دارد، اما استاتوز ساده ممکن است به عنوان شرایط خوش‌خیم در نظر گرفته شود (۲). NAFLD غالباً با چاقی، دیس‌لیپیدمی و مقاومت انسولینی در سندرم متابولیکی مرتبط می‌باشد. اگرچه این شرایط مانند التهاب و استرس اکسایشی، ممکن است افراد را در معرض ابتلا به NAFLD قرار دهد، اما مکانیسم‌هایی که زمینه‌ساز چربی کبدی هستند و باعث ایجاد آسیب سلول‌های کبدی و فیبروز کبدی در NAFLD می‌شوند عمدتاً ناشناخته می‌باشند (۳).

NAFLD شامل تجمع تری‌گلیسریدها، نکرز و آپوپتوز در سلول‌های چربی است که با پاسخ‌های التهابی در درون کبد همراه می‌شود. در مجموع این موارد احتمال ابتلا به سیروز کبدی را افزایش می‌دهد. پاتوفیزیولوژی بیماری NAFLD پیچیده و چند عاملی است. ممکن است در سلول‌های کبدی منجر به کاهش ظرفیت و عملکرد میتوکندری برای بتا-اکسیداسیون، آسیب میتوکندری، افزایش چربی درون سلولی، دخالت استرس اکسیداتیو فرآیندهای التهابی، آسیب‌های سلولی، آپوپتوز و شروع فیبروز خلاصه شود (۴).

خانواده بزرگ فاکتور رشد مبدل بتا (Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) همراه با TGF- $\beta$ 1 و اکتیوین-A جزء پروتئین‌های مورفونیک استخوانی می‌باشد و به عنوان یک سایتوکاین چندمنظوره در طیف گسترده‌ای از بافت‌ها و سلول‌ها در نظر گرفته می‌شود. این عوامل در تمایز سلولی، هموستاز تعداد سلول و ترمیم بافت، التهاب، تکثیر سلولی و آپوپتوز نقش دارند (۵). در سلول‌های کبدی نقش پیچیده‌ای به اکتیوین-A نسبت داده شده است؛ گزارش شده است که در مقابل تجمع لیپیدها می‌تواند سودمند باشد؛ اما

ممکن است باعث پیشرفت التهاب کبدی و فیبروز شود (۶). اکتیوین-A بیان کلاژن و TGF- $\beta$ 1 را افزایش می‌دهد. موجب بتا‌اکسیداسیون میتوکندریایی و تنظیم کاهش فعالیت اسید چرب سنتاز می‌شود. در تحریک کاهش در صد وزن اسیدهای چرب اشباع را نقش دارد، ترکیب اسیدهای چرب غیراشباع را تغییر داده و فعالیت متالوپروتئیناز ماتریکس را تقویت می‌کند. علاوه بر این اکتیوین-A تکثیر را مهار و آپوپتوز سلول‌های کبدی را تحریک کرده که به پایان بازسازی کبد کمک می‌کنند؛ تکثیر سلول‌های سازنده کبد و بازآفرینی کبد توسط اکتیوین-A کنترل می‌شود (۷).

امروزه برای مدیریت NAFLD تکنیک‌های اصلاح شیوه زندگی از طریق تغییر در رژیم غذایی و فعالیت بدنی مورد توجه قرار گرفته است. فعالیت بدنی اعم از هوازی، مقاومتی و تناوبی سبب کاهش بیماری NAFLD از طریق تنظیم وضعیت چربی داخل کبدی، کاهش استرس اکسیداتیو التهاب، آپوپتوز و فرآیند اتوفازی می‌شود. فعالیت منظم بدنی سبب تعدیل NAFLD نه تنها با افزایش بتا-اکسیداسیون و کاهش لیپوژنز، بلکه سبب کاهش استرس اکسیداتیو از طریق تنظیم بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD1)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPx) و کاتالاز (CAT) می‌گردد. تحقیقات نشان می‌دهد که کمترین فعالیت فیزیکی می‌تواند اثر مفید روی بیماری NAFLD داشته باشد و همچنین فعالیت بدنی از پیشرفت بیماری NAFLD جلوگیری کرده و ممکن است استراتژی‌های ارزشمندی را برای کاهش مشکلات سلامت عمومی جامعه ارائه دهد (۸).

از طرفی مواد بیولوژیک با منشأ گیاهی شاخه‌ای از فارماکوتراپی مدرن بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند. اگر چه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری‌ها وجود دارد، بلکه اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند. از سوی دیگر اکثر گیاهان اثرات جانبی بسیار اندکی بر روی بیماران به جای می‌گذارند؛ بنابراین سال‌های اخیر، ترکیب استفاده از داروهای گیاهی و پرداختن به فعالیت بدنی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از جمله این مواد رزوراترول می‌باشد که توسط گیاهان بنفش و قرمز رنگ به خصوص در پوست انگور قرمز و خانواده توت‌ها وجود

حیوانات به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (شامل ۲۲٪ چربی، ۵۰٪ کربوهیدرات، ۲۴٪ پروتئین و ۴٪ سایر موارد) قرار گرفتند (جدول ۱). برای تعیین حجم نمونه‌ها از فرمول ذیل استفاده گردید.

$$n = \frac{(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta})^2 (\delta_1^2 + \delta_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

پس از آن، رت‌های گروه بیمار NAFLD به ۷ زیرگروه و هر گروه شامل ۷ سر تقسیم شدند. گروه‌ها شامل (۱) گروه بیمار، (۲) گروه دریافت‌کننده سالین، (۳) گروه دریافت‌کننده مکمل رزوراترول، (۴) گروه تمرین تناوبی، (۵) گروه تمرین تناوبی، (۶) گروه تمرین تناوبی-رزوراترول و (۷) گروه تمرین تناوبی-رزوراترول تقسیم شدند.

قبل از شروع تمرین ورزشی اصلی، رت‌ها 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. برنامه تمرین تناوبی اصلی به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ جلسه انجام شد که در هفته آغازین با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه و زمان ۵ دقیقه بود. هر هفته به سرعت ۲-۱ متر بر دقیقه و به زمان نیز ۲-۱ دقیقه افزوده شد. در هفته هشتم سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه و زمان ۶۰ دقیقه رسید (۱۲).

برنامه تمرین تناوبی در هفته آغازین با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و زمان ۱۰-۱۵ دقیقه با شیب صفر درجه شروع شد. در هفته‌های بعدی دوره کل شامل ۱۰ دقیقه روزانه (۳۰:۲:۴) با سرعت ۵۰ متر بر دقیقه و با شیب

دارد (۹). ترانس رزوراترول یک فیتوالکسین با کاربردهای آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان و همچنین فیتواستروژن و ضدالتهاب است که برای اولین بار از یک گیاه آسیایی به نام *Polygonum capsidatum* استخراج شد (۱۰).

بعدها در گیاهان دیگر نیز وجود آن کشف شد که مهم‌ترین آن‌ها پوست و دانه‌ی انگور است. سطوح بالای رزوراترول در ضایعات قارچی نکروتیک است و این مربوط به خاصیت محافظت ذاتی برای جلوگیری از شیوع بیماری می‌باشد. اثر ضدالتهابی آن از راه کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی و جلوگیری از تولید اکسیدنیتریک در ماکروفاژها مشخص شده است. رزوراترول همچنین متابولیسم لیپیدها را تنظیم می‌کند و جلوی اکسیداسیون لیپیدها و تجمع پلاکت‌ها را می‌گیرد (۱۱).

## روش کار

در این مطالعه تجربی، تعداد ۵۶ سر رت نر مسن نژاد ویستار با سن ۴۰ تا ۵۰ هفته، میانگین وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب وارد مطالعه شدند. با توجه به تعداد گروه‌های آزمودنی و از آنجایی که آزمودنی‌ها در آزمایشگاه به لحاظ بسیاری از متغیرها تحت کنترل بودند، از این روش تحقیق از نوع تجربی بود. در ابتدا رت‌ها به دو گروه کنترل و بیمار NAFLD تقسیم شدند. رت‌ها در گروه کنترل به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی استاندارد (شامل ۱۲٪ چربی، ۵۷٪ کربوهیدرات، ۲۸٪ پروتئین و ۳٪ سایر موارد) قرار گرفتند. جهت القاء NAFLD در رت‌های گروه چربی،

جدول ۱- ترکیبات سازنده رژیم غذایی پرچرب و رژیم استاندارد گره

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

از روش آنالیز واریانس یک طرفه و در صورت مشاهده تفاوت معنی دار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معنی داری برای تمام محاسبات  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

### یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون آنوای یک طرفه تفاوت معنی داری در میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی  $TGF-\beta$  بین گروه‌های مختلف تحقیق نشان داد ( $P=0/0001$ ). همچنین نشان داده شد که تمرین هوازی و عصاره انگور قرمز (رزوراترول) بر سطوح سرمی  $TGF-\beta$  در رت‌های مسن مبتلا به NAFLD در گروه‌های مختلف تأثیر معنی داری دارد ( $P=0/0001$ ) (شکل ۱). میانگین و انحراف معیار مربوط به سطوح سرمی  $TGF-\beta$  در گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان می‌دهد که رزوراترول+تمرین تناوبی و بیشترین سطوح آن در گروه بیمار و سالمین است (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل داده‌های سطوح سرمی اکتیوین-A، تفاوت معنی داری را بین گروه‌های مختلف نشان داد ( $P=0/0001$ ). همچنین نشان داده شد که تمرین هوازی و عصاره انگور قرمز (رزوراترول) بر سطوح سرمی اکتیوین-A در رت‌های مسن مبتلا به NAFLD در گروه‌های مختلف تأثیر معنی داری دارد ( $P=0/0001$ ) (شکل ۲). میانگین و انحراف معیار مربوط به سطوح سرمی اکتیوین-A در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

۱۰ درجه با دوره‌های ۲:۳۰ دقیقه (بیش از ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) بود که با دوره‌های استراحتی ۳ دقیقه جدا می‌شد. تعداد جلسات ۵ جلسه در هفته انجام شد (۱۳).

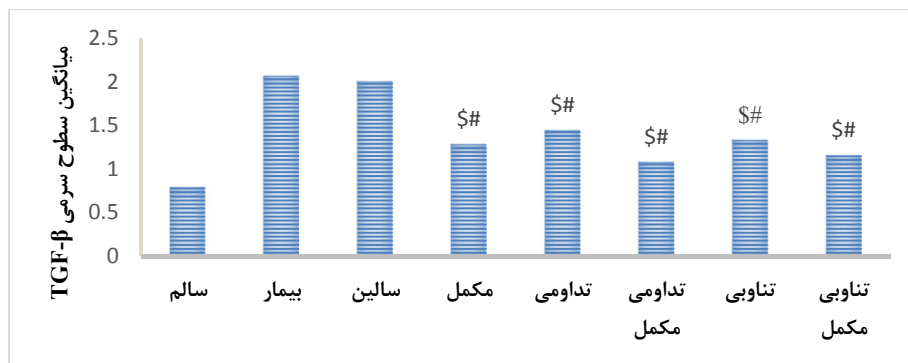
مکمل رزوراترول بر اساس مطالعات پیشین تهیه و برای هر بار تجویز رزوراترول، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷ درصد یا DMSO ۱۰ درصد با آب به ازاء هر رت تهیه و رزوراترول را در آن معلق نموده و تجویز شد. برای کاهش درصد خطا برای کلیه آزمودنی‌ها محلول به صورت یک جا تهیه شد. در گروه‌های مکمل و مکمل+تمرین با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به آنان تزریق شد. این برنامه مکمل‌دهی به مدت ۸ هفته بود.

پس از اتمام دوره تحقیق، تمام رت‌ها 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 میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم از وزن بدن) با نسبت ۵ به ۲ بی‌هوش شدند. نمونه‌های کبد در دمای ۸۰- سانتی‌گراد ذخیره شد تا برای بررسی‌های بعدی جهت اندازه‌گیری بیومارکرهای اکتیوین-A و  $TGF-\beta$  مورد مطالعه قرار گیرند. اندازه‌گیری سطوح سرمی اکتیوین-A و  $TGF-\beta$  با استفاده از کیت و به روش الایزا اندازه‌گیری شد.

جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات معنی داری هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی  $TGF-\beta$

گروه	$TGF-\beta$ (U/mg)
بیمار	$21.065 \pm 1.327$
سالمین	$19.997 \pm 0.242$
مکمل	$19.282 \pm 0.427$
تمرین تناوبی	$17.44 \pm 0.15$
تمرین تناوبی+رزوراترول	$17.08 \pm 0.27$
تمرین تناوبی	$17.33 \pm 0.174$
تمرین تناوبی+رزوراترول	$17.155 \pm 0.23$



شکل ۱- تغییرات میانگین سطوح سرمی TGF-β در گروه‌های مختلف

(# وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار با دیگر گروه‌ها)

(\$ وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه سالین با دیگر گروه‌ها)

جدول ۳- میانگین و انحراف استاندارد سطوح سرمی اکتیوین-A

گروه	اکتیوین-A (U/mg)
بیمار	31/27 ± 0/91
سالین	32/85 ± 1/68
مکمل	21/9 ± 0/48
تمرین تداومی	29/45 ± 1/28
تمرین تداومی+رزوراترول	20/93 ± 0/74
تمرین تناوبی	26/99 ± 0/94
تمرین تناوبی+رزوراترول	21/52 ± 0/81



شکل ۲- تغییرات سطوح سرمی اکتیوین-A در گروه‌های مختلف

(# وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار با دیگر گروه‌ها)

(\$ وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه سالین با دیگر گروه‌ها)

همچنین مشاهده شد تمرین هوازی و عصاره انگور قرمز (رزوراترول) بر سطوح سرمی TGF-β و اکتیوین-A در رت‌های مسن مبتلا به NAFLD در گروه‌های مختلف تأثیر معنی‌دار دارد.

NAFLD یک بیماری است که طیف وسیعی از بیماری‌ها از رسوب چربی در کبد تا التهاب کبدی ناشی از رسوب چربی و سیروز کبدی را شامل می‌شود. این

نشان می‌دهد که کمترین میزان در گروه مکمل رزوراترول+تمرین تداومی و بیشترین سطوح آن در گروه بیمار و سالین می‌باشد (جدول ۳).

## بحث

نتایج تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری سطوح سرمی TGF-β و اکتیوین-A بین گروه‌های تحقیق نشان داد.

۴۷

اکتیوین-A در بیماری NAFLD پرداخته‌اند. بیماران مبتلا به NAFLD سطوح سرمی اکتیوین-A را در مقایسه با گروه‌های سالم به طور معنی‌داری افزایش دادند. در بیماران مبتلا به استئاته هیپاتیت غیر الکلی سطوح بالای اکتیوین-A وجود داشت که به طور قابل توجهی با درجه فیروز کبدی مرتبط بود. در سلول‌های کبدی، اکتیوین-A باعث افزایش بیان کلاژن و TGF-1 می‌شود که فعالیت متالوپروتیناز ماتریکس را تشدید می‌کند. همچنین فعالیت سنتاز اسیدهای چرب تنظیم نشده (FA)، باعث کاهش درصد وزن FAهای اشباع شده و ترکیب اشباع نشده FA یافته‌های ما نقش پیچیده‌ای از اکتیوین-A در پاتوژنز NAFLD را پشتیبانی می‌کند که شامل اثرات آن بر فیروز و تجمع لیپیدها می‌شود (۶).

اکتیوین-A حداقل تا حدی به دلیل توانایی آن در القای فعال شدن ماکروفاژ، با التهاب کبدی نیز مرتبط است. با این حال، نقش اکتیوین-A در اختلالات کبدی ممکن است بسیار پیچیده‌تر باشد. از این رو، هر دو اثر پیش‌التهابی و ضدالتهابی برای اکتیوین-A توصیف شده است. به سرعت در حین التهاب سیستمیک ایجاد می‌شود. اکتیوین-A به سرعت در حین التهاب سیستمیک ایجاد می‌شود و می‌تواند با اثرات واسطه‌ای اینترلوکین-6 را در سلول‌های کبدی مخالفت کند (۱۵). اکتیوین-A همان‌طوری که قبلاً گزارش شده است موجب تولید کبدی ماتریکس خارج سلولی که حداقل بخشی از آن شامل سنتز فیبرونکتین و کلاژن به موجب القای اکتیوین-A در سلول‌های ستاره‌ای کبد می‌شود (۱۶). این یافته‌ها می‌تواند در چندین راه گسترش یابد. نشان داده شده است، این احتمال وجود دارد که اکتیوین-A ممکن است سنتز کلاژن را در سلول‌های کبدی نیز ارتقا دهد. علاوه بر عملکرد اکتیوین-A، TGF- $\beta$  محرکی قوی فیبروز در سلول‌های ستاره‌ای کبد می‌باشد و یافته‌های ما از افزایش قابل توجه TGF- $\beta$  به موجب اکتیوین-A در سلول‌های کبدی در محیط آزمایشگاهی باعث افزایش بیشتر ارتباط اکتیوین-A در پیشرفت و توسعه فیروز کبدی می‌شود (۱۷).

بیماری یک وضعیت بالینی است که با افزایش مزمن آنزیم‌های کبدی و همچنین آسیب سلول‌های کبدی همراه می‌باشد. امروزه عدم فعالیت جسمانی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل خطر ساز مستقل برای پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی محسوب می‌گردد (۴). یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که کمترین سطوح سرمی اکتیوین-A در گروه مکمل رزوراترول+تمرین تداومی و بیشترین سطوح آن در گروه بیمار و سالمین مشاهده شد. کبد چرب موجب افزایش سطوح اکتیوین-A در گروه بیمار شد و همچنین تمرین هوازی و عصاره انگور قرمز (رزوراترول) موجب کاهش معنادار سطوح سرمی اکتیوین-A در رت‌های مسن مبتلا به NAFLD در گروه مکمل رزوراترول+تمرین تداومی شد؛ البته در گروه مکمل، تمرین تداومی و تمرین تناوبی+رزوراترول نیز روند کاهش‌دهنده داشت، اما به سطح معناداری نرسید. اعتقاد بر این است که NAFLD ناشی از عدم تعادل بین سنتز اسیدهای چرب کبدی و اکسیداسیون است (۵). یافته‌های ما نشان می‌دهد که NAFLD باید به لیست اختلالات کبدی که می‌تواند مکانیسم‌های واسطه اکتیوین-A باشد، اضافه شود. پیش از این اکتیوین-A گزارش شده بود که با مهار تکثیر کبدی و القای آپوپتوز و همچنین با القای تولید ماتریکس خارج سلولی در هنگام فیروز کبد، رشد کبدی را مهار می‌کند (۱۴).

نشان داده شده است که اکتیوین-A می‌تواند بیان کلاژن III و TGF-1 و فعالیت MMP را ترویج کند و همچنین باعث القاء اکسیداسیون میتوکندری (افزایش فعالیت CPT-I) و تنظیم کاهشی سنتز اسید چرب (از طریق کاهش FAS) در سلول‌های کبدی شود. این نتایج تأکید بر نقش پیچیده اکتیوین-A در اختلالات کبدی، شامل پاسخ‌های سازگار و ناسازگار است. پولیزوس و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی به بررسی نقش اکتیوین-A و فولیستاتین در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی پرداختند. نتایج تحقیق نشان داد که سطوح اکتیوین-A روند افزایشی پیش‌رونده از گروه کنترل به گروه تجربی را نشان داد (۴). یونس‌تاد و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی به بررسی نقش پیچیده

شرایط را وخیم‌تر کند (۵). این فرضیه شبیه نقش لپتین در NAFLD است؛ همانطور که در جای دیگر پیشنهاد کردیم، به نظر می‌رسد که لپتین در اوایل NAFLD دارای اثر ضد استئاتوتیکی باشد؛ اما ممکن است در صورت پیشرفت بیماری به التهاب و فیبروز کمک کند (۴). مطالعات تجربی اولیه نشان داد که اکتیوین-A در ترمیم معماری بافت در هنگام بازسازی کبد نقش دارد. از طرف دیگر اکتیوین-A باعث آپوتوز کبدی می‌شود و رشد کبدی را مهار می‌کند (۲۲).

در گذشته، نقش محافظ رزوراترول در برابر آسیب‌های کبدی به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی نسبت داده شده است. در مطالعه حاضر، درمان رزوراترول با افزایش سطح سیتوکین فیبروز نیک برجسته TGF- $\beta$ 1 ناشی از NFALD جلوگیری کرده است و موجب کاهش معنادار سطح TGF- $\beta$  شده است که این یافته حاکی از اثر مهاری رزوراترول به فعالیت تکثیر دهنده HSCs است. علاوه بر این فیروز کبدی احتمالی ناشی از NFALD با فعال‌سازی مشخص Smad2/3 همراه بود و احتمال دارد در مان رزوراترول قادر به مهار فسفوریلاسیون Smad2/3 بوده و اثر NFALD را معکوس کرده باشد. رزوراترول به دلیل داشتن خاصیت ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و اثرات محدودکننده کالری، گزینه درمانی بالقوه برای مدیریت بیماری NAFLD است. شواهد موجود برای حمایت از اثربخشی رزوراترول در مدیریت NAFLD کافی نیست. رزوراترول در جه فیروز کبد را ضعیف نمی‌کند و یا کاهش قابل توجهی در هر یک از پارامترهای آن نشان نمی‌دهد. هاسین و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی به بررسی اثر ریمونابانتیک آنتاگونیست گیرنده کانابینوئید قوی ۱ (CB1) بر NAFLD ناشی از رژیم غذایی کمبود کولین (CD) در موش صحرایی و همچنین برای تعیین اینکه آیا می‌تواند بیان کبدی اکتیوین-A و فولی‌ستاتین را تنظیم کند یا خیر پرداختند. مشخص شد که رژیم غذایی باعث افزایش معنی‌دار در شاخص کبد، سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی، مالون دی‌آلدئید (MDA)، TGF- $\beta$ 1، اکتیوین-A و بیان CB1 در کبد شد. بافت با کاهش قابل توجهی در گلوکاتایون پراکسیداز (-GSH)

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطوح TGF- $\beta$  در گروه مصرف غذای پرچرب افزایش یافت؛ در حالی که تمرین و مکمل رزوراترول موجب کاهش سطح TGF- $\beta$  در گروه‌های تجربی شد. علاوه بر این، TGF- $\beta$ 1 به عنوان یک پروتئین غیرفعال متصل به یک پپتید مرتبط با تأخیر ذخیره می‌شود. پس از فعال‌سازی، TGF- $\beta$ 1 گیرنده‌های مرتبط و عملکردهای آن را به فعالیت‌های بیولوژیکی و آسیب‌شناختی خود از طریق مسیره‌های سیگنالینگ وابسته به Smad و وابسته به آن متصل می‌کند. مولکول‌های انتقال‌دهنده Smads سیگنال درون سلول از خانواده فوق‌العاده TGF- $\beta$  هستند. تصور می‌شود که مسیره‌های انتقال سیگنال Smad به واسطه سنتز کلاژن ناشی از TGF- $\beta$  1 و نقش مهمی در روند آسیب و بهبودی کبد و همچنین در ایجاد فیروز کبدی ایفا می‌کنند (۱۸). مطالعات نشان داده‌اند که مسیره سیگنالینگ TGF- $\beta$ 1/Smad ممکن است نقش مهمی در فعال‌سازی HSCها و تنظیم تولید، تخریب و تجمع پروتئین‌های ECM داشته باشد (۱۹)؛ بنابراین، مهار مسیره سیگنالینگ TGF- $\beta$  /Smad می‌تواند یک هدف درمانی جذاب برای پیشگیری از فیروز کبدی است (۲۰). ستوده و همکاران (۱۳۹۶) در پژوهشی به بررسی تأثیر حفاظتی هشت هفته تمرین هوازی تناوبی بر بیان دکورین، TGF- $\beta$  و حجم تومور در مدل حیوانی سرطان پستان پرداختند. نتایج نشان داد که میزان بیان TGF- $\beta$  در بافت تومور در گروه ورزش به همراه تومور نسبت به گروه توموری کاهش معناداری دارد که با نتایج تحقیقات حاضر همسو می‌باشد. نتایج نشان داد که تمرینات هوازی تناوبی احتمالاً با کاهش بیان TGF- $\beta$  در کاهش رشد سلول‌های سرطان پستان نقش دارد که اهمیت این نوع تمرین ورزشی را در مهار رشد تومور در سرطان پستان نشان می‌دهد (۲۱).

بر اساس یافته‌های تحقیقات مختلف، یونس‌تاد و همکاران (۲۰۱۱) پیشنهاد کردند که این امکان وجود دارد که اکتیوین-A نقش دوگانه در پاتوژنز NAFLD داشته باشد؛ ممکن است اکتیوین-A از استئاتوز محافظت کند، اما زمانی که بیماری پیشرفت می‌کند این احتمال وجود دارد که التهاب و فیروز را بدتر و

## References

1. Polyzos SA, Mantzoros CS. Nonalcoholic fatty future disease. *Metab Clin Exper*. 2016;65(8):1007-16.
2. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016; 65:1038-1048.
3. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol*. 2002; 37(1):56-62.
4. Polyzos SA, Kountouras J, Anastasilakis AD, Triantafyllou GA, Mantzoros CS. Activin A and follistatin in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(10):1550-8.
5. Yndestad A, Haukeland JW, Dahl TB, Halvorsen B, Aukrust P. Activin A in nonalcoholic fatty liver disease. *Vitam Horm*. 2011;85:323-42.
6. Yndestad A, Haukeland JW, Dahl TB, Bjørø K, Gladhaug IP, Berge C, et al. A complex role of activin A in non-alcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(9):2196-205.
7. Ding ZY, Jin GN, Wang W, Sun YM, Chen WX, Chen L, et al. Activin A-Smad Signaling Mediates Connective Tissue Growth Factor Synthesis in Liver Progenitor Cells. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:408.
8. Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME, et al. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(2):E243-53.
9. Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS, Haykowsky M, Czubyrt MP, Gordon T, et al. Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *J Physiol*. 2012;590(11):2783-99.
10. Dolinsky VW, Chan AY, Robillard Frayne I, Light PE, Des Rosiers C, Dyck JR. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. *Circulation*. 2009;119(12):1643-52.
11. De La Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(5):1156-60.
12. 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;184:6-11.
13. Batacan Jr RB, Duncan MJ, Dalbo VJ, Connolly KJ, Fenning AS. Light-intensity and high-intensity interval training improve cardiometabolic health in

(Px) و بیان mRNA فولیستاتین در بافت‌های کبدی شد. تجویز ریمونابانت باعث بهبود معنی‌داری در کلیه پارامترهای مورد مطالعه در مقایسه با گروه رژیم غذایی شد. معاینه بافت‌شناسی از این موارد پشتیبانی می‌کند. ما نتیجه گرفتیم که ریمونابانت به طور قابل توجهی ضد NAFLD ناشی از رژیم غذایی با کاهش استرس اکسیداتیو، بیان کبدی TGF- $\beta$  و تعدیل بیان کبدی اکتیوین-A و فولستاتین را موجب می‌شود (۲۳). در تحقیق حاضر نیز مصرف مکمل رزوراترول باعث کاهش سطوح TGF- $\beta$  و اکتیوین-A در گروه‌های تجربی شد که با تحقیقات بالا همسو می‌باشد. رزوراترول می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری و درمان اختلالات کبدی ایفا کند. مطالعات قبلی خواص آنتی‌اکسیدانی آن را در مدل‌های مختلف هپاتیت و در نتیجه کاهش فیبروز کبدی تأیید کرده است (۲۴).

## نتیجه‌گیری

در نهایت یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که سطوح سرمی TGF- $\beta$  و اکتیوین-A در رت‌های مبتلا به NFALD افزایش یافته است؛ این احتمال وجود دارد که دلیل افزایش سطوح سایتوکاین‌ها احتمالاً به خود فرآیند سیروز مربوط باشد. در تحقیقات قبلی نشان داده شده است که عملکرد ضعیف کبد به طور ثانویه منجر به سیروز شده که متابولیسم TGF- $\beta$  را مختل کرده و موجب تجمع این سایتوکاین‌ها چند منظوره در بدن می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که ورزش ممکن است اثرات مخرب یک رژیم غذایی HF بر کبد را کاهش دهد و نشان می‌دهد که ممکن است بیان موضعی اکتیوین باشد.

## تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری در جهت کمک به انجام این تحقیق تشکر می‌نمایم. این تحقیق با تأیید کمیته اخلاق در دانشگاه آزاد ساری و با کد R.IAU.SARI.REC.1397.8 نیز به تصویب رسید.

- rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016;41(9):945-52.
14. Patella S, Phillips DJ, Tchongue J, de Kretser DM, Sievert W. Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(1):G137-44.
15. Jones KL, De Kretser DM, Patella S, Phillips DJ. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Mol cell endocrinol*. 2004;225(1-2):119-25.
16. Rodgarkia-Dara C, Vejda S, Erlach N, Losert A, Bursch W, et al. The activin axis in liver biology and disease. *Mutat Res*. 2006;613(2-3):123-37.
17. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:S79-84.
18. Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor  $\beta$  Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*. 2007;56(2):284-92.
19. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.
20. Liu RM, Pravia KG. Oxidative stress and glutathione in TGF- $\beta$ -mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(1):1-5.
21. Sotoodeh V, Gharakhanloo R, Khaligh fard S, Khaligh fard S, Alizadeh A. Protective effects of eight weeks interval aerobic exercise on decorin, TGF- $\beta$  and tumor volume in atypical animal of breast cancer. *JSMT*. 2017; 15 (14):59-71.
22. Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, La C, Terrel TG. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology*. 1993;18(2):347-56.
23. Hussien NI, El-Kerdasy HI, Ibrahim ME. Protective effect of rimonabant, a cannabinoid receptor 1 antagonist, on nonalcoholic fatty liver disease in a rat model through modulation of the hepatic expression of activin A and follistatin. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(12):1433-41.
24. Lee ES, Shin MO, Yoon S, Moon JO. Resveratrol inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Arch Pharm Res*. 2010;33(6):925-32.