

مقاله پژوهشی

مقایسه تأثیر ویتامین E و بره موم (پروپولیس) بر ایتنرلوکین-5 و بیان ژن STAT1 در موش‌های
ویستار مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

سعیده بارفروش، مریم بنانج*، رامین حاجی‌خانی، هنگامه علی بیک

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: maryambananaj@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1953654.1371

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۱

چکیده

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یک نگرانی فزاینده برای سلامتی در سراسر جهان است. متأسفانه دانشمندان موفق به یافتن روش درمانی مناسب برای این بیماری نشده‌اند و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. مطالعات نشان داده‌اند که درمان با آنتی-اکسیدان‌ها در این بیماری مؤثر است. در این مطالعه، اثر دو آنتی‌اکسیدان مختلف بر NAFLD القا شده به رت‌های ویستار نر ارزیابی شد. این مطالعه بر روی ۳۲ سر رت نر ویستار با وزن ۲۰۰ گرم انجام شد که بصورت تصادفی به چهار گروه هشت‌تایی تقسیم شدند. موش‌ها توسط امولوسیون پرچرب به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۴۰ روز با گاوآذ تغذیه شدند. پس از ابتلا به کبدچرب، میزان ایتنرلوکین-5 (IL-5) سرمی اندازه‌گیری شد و همچنین با استفاده از Real-time PCR، میزان بیان ژن STAT1 تعیین گردید. یافته‌ها نشان داد که میزان IL-5 سرمی در گروه بیمار بصورت معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش داشت و تیمار گروه‌ها با ویتامین E و بره موم میزان ایتنرلوکین-5 را بصورت معناداری نسبت به گروه بیمار کاهش داد ($p < 0/05$). بعلاوه، بیشترین کاهش مربوط به گروه بره موم بود ($p < 0/05$). از طرفی دیگر، میزان بیان ژن STAT1 نیز در گروه مبتلا به کبدچرب بصورت معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($p < 0/05$)؛ درحالی‌که، پس از تیمار با آنتی‌اکسیدان‌ها بیان این ژن کاهش یافت ($p < 0/05$). براساس نتایج بدست آمده، استفاده از بره موم و همچنین ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با کاهش ایتنرلوکین‌التهابی و همچنین کاهش بیان ژن موثر در شکل‌گیری NAFLD، نقش درمانی امیدوارکننده‌ای در کبد چرب غیرالکلی دارند.

کلمات کلیدی: ژن STAT1، ایتنرلوکین-5، بره موم، ویتامین E، کبد چرب غیرالکلی.

مقدمه

همچنین تغییر عوامل سیستمیک (به ویژه مقاومت به انسولین) که تعادل بین هجوم یا سنتز لیپیدهای کبدی و خروج یا اکسیداسیون آنها را کنترل می‌کند، منجر به تجمع تری‌گلیسیرید کبدی می‌شود (۴، ۳۷). تشخیص NAFLD نیاز به شواهدی از تغییرات چربی

کبد نقش اساسی در متابولیسم لیپید، تولید، ذخیره و خارج کردن لیپوپروتئین‌ها دارد. عواملی که منجر به آسیب پیشرونده سلول‌های کبدی پس از تجمع تری-گلیسیرید می‌شوند بعنوان عوامل پاتوفیزیولوژیک در شکل‌گیری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) است.

پیشرفت آن به فیروز روشن است، بعلاوه استرس اکسیداتیو نقشی اساسی در ایجاد آسیب کشنده سلول‌های کبدی مرتبط با NAFLD دارد (۷، ۹).

استرس اکسیداتیو سلول کبدی، خصوصاً اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد سیتوتوکسیک (FFA)، تولید سایتوکاین‌ها را تنظیم، بیان ۱E۲ آنزیم P450 سیتوکروم را القا و غلظت آنتی اکسیدان‌های کبدی را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. افزایش تولید سایتوکین باعث فعال شدن سلول‌های کبدی ستاره‌ای و منجر به فیبروز و رسوب پروتئین ماتریکس خارج سلولی می‌شود. مطالعات متفاوتی نشان داده است که ویتامین E تولید سایتوکین پیش التهابی را مهار کرده و تولید فیروز کبدی/ کلاژن را کاهش می‌دهد. مکمل آن به طور قابل توجهی ذخایر گلوکاتایون کبدی را بازیابی نموده، استرس اکسیداتیو، فیروز کبدی و رسوب کلاژن را در مدل‌های موش مبتلا به NASH را تضعیف می‌کند (۲۲، ۲۵).

بره موم (پروپولیس) نوعی ماده رزینی است که توسط زنبورهای عسل تولید می‌شود و طی سال‌های اخیر توجهات را به خود جلب کرده است. مطالعات اثرات مختلف بره موم از جمله سیتوتوکسیکی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، زداینده رادیکال‌های آزاد، ضد التهاب، بی‌حسی موضعی، محافظت کبدی، ضد تومور و تحریک‌کننده سیستم ایمنی بدن را مطرح کرده‌اند. در میان این اثرات بالقوه، فعالیت آنتی‌اکسیداتیو این ماده توسط بسیاری از مطالعات برجسته شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که بره موم می‌تواند پارامترهای اکسیداتیو را تا ۶۷ درصد کاهش دهد (۱۷، ۳۸).

با توجه به مطالعات ذکر شده مبنی بر خاصیت آنتی-اکسیدانی بره موم و تأثیرات مثبت آن بر فاکتورهای بیوشیمیایی و بافت کبد چرب غیرالکلی (۱۲، ۱۳، ۳۶) و تأثیر ویتامین E بر پارامترهای کبدی در ابتلا به

کبد در غیاب سابقه مصرف بیش از حد الکل دارد. طیف هیستولوژیک NAFLD از استئاتوز خفیف، ملایم تا استئاتوز همراه با التهاب و آسیب سلول‌های کبدی (استئاتوهپاتیت غیرالکلی یا NASH) گسترش می‌یابد، که ممکن است با فیروز پیش‌رونده و سیروز همراه باشد (۴). شیوع NAFLD به موازات افزایش چاقی و دیابت نوع ۲ به سرعت در سراسر جهان در حال افزایش است. توجه به این نکته مهم است که این شیوع تا حدی به روش استفاده شده در تشخیص کبد چرب بستگی دارد. شیوع NAFLD در جمعیت عمومی در کشورهای غربی ۲۰ تا ۳۰ درصد و در کشورهای آسیایی ۱۵ درصد تخمین زده شده است (۴۰).

ورزش و اصلاح رژیم غذایی در مقابله با NAFLD، اساساً مبتنی بر محدود کردن مصرف اسیدهای چرب اشباع و افزایش مصرف پروتئین و استفاده از آنتی-اکسیدان‌های طبیعی توصیه می‌گردد (۲، ۲۴).

ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده و از مکمل‌های ضروری است. مصرف روزانه رژیم غذایی ویتامین E در بزرگسالان عادی بسته به سن و محیط اطراف ۱۵-۳ میلی‌گرم است. با توجه به اینکه ویتامین E مهم‌ترین زداینده رادیکال لیپوفیلی در داخل بدن است، آن را به یکی از مکمل‌های دارای اثر بالقوه بر آپوپتوز سلول ناشی از استرس اکسیداتیو تبدیل می‌کند (۸، ۹، ۲۰، ۲۶، ۳۲).

ویتامین E اصلترین آنتی‌اکسیدان محلول در چربی در بدن انسان است. فعالیت بیولوژیکی ویتامین E محدود به خواص آنتی‌اکسیدانی نیست. در حقیقت، فرم‌های ویتامین E در تنظیم پاسخ التهابی، بیان ژن، آنزیم‌های متصل به غشا، تعدیل سیگنالینگ سلولی و تکثیر سلولی نقش دارند. مولکول‌های خانواده ویتامین E علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیداتیو، فعالیت‌های ضد التهابی نیز دارند. پاتوزن NAFLD و

گرم آب مقطر در نظر گرفته شد. رت‌های هدف تحت این رژیم به مدت ۴۰ روز، روزانه دو بار بوسیله گاوآژ تغذیه شدند (۴۱).

گروه‌های مطالعه شامل: گروه کنترل (رت‌های سالم که روزانه ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم نرمال سالیان با گاوآژ دریافت کردند)؛ گروه بیمار (رت‌هایی که جهت القای کبد چرب، رژیم روزانه امولسیون پرچرب به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۴۰ روز دریافت داشتند و بدن‌بال آن ۲۸ روز دریافت روزانه ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم نرمال سالیان)؛ گروه ویتامین E (رت‌هایی که جهت القای کبد چرب، رژیم روزانه امولسیون پرچرب به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۴۰ روز دریافت داشتند و بدن‌بال آن ۲۸ روز دریافت روزانه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E بوسیله گاوآژ)؛ گروه بره موم (رت‌هایی که جهت القای کبد چرب، رژیم روزانه امولسیون پرچرب به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۴۰ روز دریافت داشتند و بدن‌بال آن ۲۸ روز دریافت روزانه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بره موم با گاوآژ) طبقه‌بندی شدند. پس از این مدت، وزن‌گیری در تمام گروه‌ها انجام و نتایج ثبت گردید (۴۱).

سنجش اینترلوکین-۵: میزان غلظت سرمی اینترلوکین-۵ از هر چهار گروه کنترل و بیمار و تیمار با استفاده از تکنیک الایزا و از کیت ELISA (IL-5)-5 (EASTBIOPHARM Co, China, Hangzhou) سنجش گردید. در چاهک‌های نمونه ۴۰ میکرولیتر از محلول نمونه و در چاهک‌های استاندارد ۵۰ میکرولیتر استاندارد آماده شده اضافه گردید و به هر دو نوع چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مربوط به اینترلوکین-۵ افزوده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پلیت برای ۵ بار شستشو شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های کروموزن A و B به درون هر چاهک اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در

NAFLD و خواص آنتی‌اکسیدانی آن (۲۲، ۳۸)، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر ویتامین E و بره موم بر اینترلوکین-۵ (IL-5) در موش‌های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه دارای کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC. 1398.068 از دانشگاه آزاد واحد تهران شمال می‌باشد و تمام پروتکل‌های آزمایش و نگهداری حیوانات توسط کمیته اخلاق در دانشگاه تأیید شده و مطابق با دستورالعمل‌های نهادی انجام شده است

حیوانات مورد آزمایش: در این مطالعه، ۳۲ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 10 ± 180 گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری و به مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد تهران منتقل گردید. ابتدا حیوانات به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط محیطی با میانگین دمای 2 ± 22 درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵۵-۴۰ درصد و رعایت چرخه روشنایی/تاریکی هر کدام به مدت ۱۲ ساعت و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. (۲۰).

طراحی آزمایش: پس از دو هفته جهت سازگاری با محیط جدید، تمامی حیوانات بصورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند و هر گروه به شامل ۸ سر رت نر نژاد ویستار می‌باشد که بصورت تصادفی تقسیم و بصورت مجزا در قفس‌های پلی استیرن قرار گرفتند، وزن‌گیری نیز قبل از القای کبد چرب انجام شد. جهت القای کبد چرب، رژیم غذایی امولسیون پرچرب شامل ترکیباتی همچون ۴۰۰ گرم روغن ذرت، ۱۵۰ گرم سوکروز، ۸۰ گرم پودر شیر کامل، ۱۰۰ گرم کلسترول، ۱۰ گرم سدیم دیاکسیکلات، ۴/۳۶ گرم پلیسوربات، ۲ گرم پروبیلن گلیکول، ۵ گرم مولتیویتامین، ۱۰ گرم نمک، ۵ گرم مواد معدنی، ۳۰۰

مراحل مربوط به روش Real time PCR با استفاده از سایبرگرین SYBR®Premix Ex Taq™ (TaKaRa)، دالیان، چین) انجام گرفت. آنالیز داده‌های حاصله بصورت $2^{-\Delta\Delta Ct}$ است (۱، ۱۰).

آنالیز آماری: نتایج آزمون به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (Mean \pm SEM) گزارش گردید. در مورد نتایج حاصل سنجش پارامترها، از آنالیز آنوای یکطرفه، و تست توکی استفاده شد. آنالیز آماری در برنامه SPSS 26 انجام گردید و جهت رسم نمودارها از برنامه Excel 2010 Microsoft استفاده شد. لازم به ذکر است در مورد کلیه یافته‌های این تحقیق اختلاف در سطح ($p < 0/05$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است (۱۲).

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از اضافه کردن محلول توقف چگالی نوری (OD) هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مدت ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد (۱۶، ۲۹).

سنجش میزان بیان ژن STAT1 به روش Real-time PCR
برای سنجش بیان ژن بررسی فعالیت ژن STAT1 از روش Real-time PCR استفاده شد. جهت انجام Real-time PCR ابتدا استخراج RNA از لکوسیت‌ها با استفاده از کیت تجاری TRIzol انجام شد. سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit) طبق دستورالعمل انجام شد. همچنین برای ژن مورد بررسی در این مطالعه (ATG, GAPDH) طراحی پرایمر (به شرح جدول ۱) شده و در ادامه

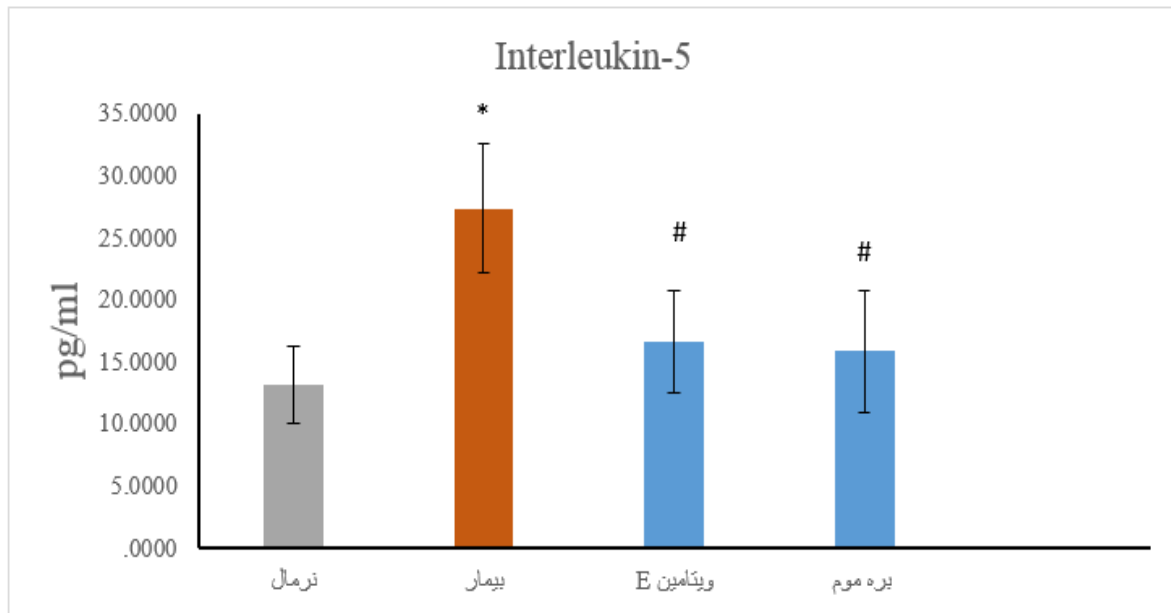
جدول ۱- توالی پرایمر ژن STAT1

ژن	پرایمر	توالی پرایمر	دمای ذوب	طول قطعه تکثیرشونده (جفت باز)
STAT1	F	5'- TTCATCATCGAGAAGCAGCC -3'	۶۰/۵	۱۹۶
	R	5'- ACTGCCAGAAGGTATAGTTC -3'	۶۱	

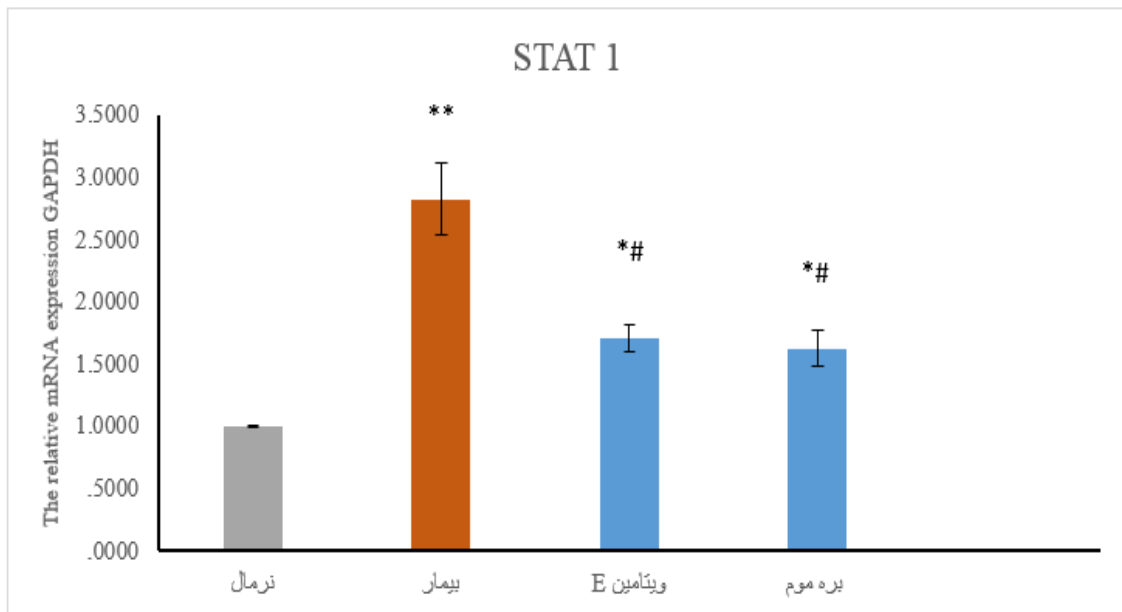
نتایج

میزان بیان ژن STAT1 در گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد، با توجه به این نمودار بیان ژن STAT1 در گروه بیمار افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت ($p < 0/05$) (نمودار ۲). تیمار با ویتامین E و بره موم، بیان ژن STAT1 در رت‌های مبتلا به کبدچرب تیمار شده کاهش معناداری نسبت به گروه شم نشان دادند ($p < 0/05$).

میزان IL-5 سرم در گروه بیمار بطور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p < 0/05$) و با تیمار رت‌های مبتلا به کبدچرب با دو آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه، IL-5 در گروه‌های درمان کاهش معناداری نسبت به گروه شم داشتند ($p < 0/05$) که بیشترین کاهش ایتترولوکین-۵ در گروه تیمار با بره موم مشاهده گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱- تاثیر تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه ویتامین E و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر میزان سرمی اینترلوکین-۵ در مدل رت نژاد ویستار مبتلا به کبد چرب. * در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0/05$) و # در مقایسه با گروه بیمار (کبد چرب) ($p < 0/05$).



نمودار ۲- تاثیر تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، روزانه ویتامین E و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر میزان بیان ژن STAT1 در مدل رت نژاد ویستار مبتلا به کبد چرب. * در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0/05$), ** در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0/01$) و # در مقایسه با گروه بیمار (کبد چرب) ($p < 0/05$).

بحث

افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاهش تنظیم ژن‌های مرتبط با التهاب، آپوپتوز و فیروز همراه بود. مطالعه دیگری با استفاده از مدل استئوپاتیت ناشی از رژیم غذایی نشان داد که میزان گلوکاتیون کبدی و کاهش مارکرهای استرس اکسیداتیو، فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبدی و فیروز بافت‌شناسی در موش‌های دارای ویتامین E نشان داده شده است (۲۸).

یک مدل چاقی ناشی از رژیم غذایی در موش صحرائی همچنین بهبود استرس اکسیداتیو را علاوه بر بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پس از مداخله ویتامین E نشان داد (۲۹). درمان ویتامین E همچنین با بهبود التهاب پورتال، لوبولار، نکروز سلول‌های کبدی و اثر حفاظتی در برابر مسمومیت ناشی از اسید صفراوی در موش، کمبود گیرنده لپتین را تأمین کرد (۳۱).

قابل توجه است، ویتامین E بیان $TGF-\beta 1$ ، سایتوکینی را که در توسعه فیروز کبد نقش دارد، تنظیم می‌کند (۳، ۲۱). اگرچه با وجود مطالعات بالینی، اپیدمیولوژیک و پایه برای روشن‌سازی مکانیسم‌های توسعه NAFLD، پاتوژنز بیماری کبد چرب غیرالکلی هنوز کاملاً مشخص نیست. با اینحال، یکی از نقش‌های اصلی در ایجاد و پیشرفت کبد چرب غیرالکلی را استرس اکسیداتیو دارد. چندین مطالعه در مورد ویتامین E و همچنین متآنالیزها در مورد اثر آنتی-اکسیدان‌های کل بر بیماری کبد چرب غیرالکلی منتشر شده است (۱۴، ۱۹، ۳۴).

برخی مطالعات سیستماتیک در مورد اثر ویتامین E بر بهبود کبد چرب غیرالکلی و فیروز کبدی را تأیید نمودند (۱۱، ۳۴).

این مطالعه نیز در توافق با یافته‌های پیشین نشان داد که ویتامین E پتانسیلی برای درمان کبد چرب غیرالکلی نه تنها بوسیله اثرات آنتی‌اکسیدانی عمده که

این مطالعه بر روی کبد چرب نر نژاد ویستار تحت تیمار با آنتی‌اکسیدان طبیعی شامل بره موم و ویتامین E طراحی گردید. شیوع بیماری کبد چرب غیرالکلی همانطور که در مطالعات گذشته مشخص گردید، در حال افزایش است و به طور کلی شیوع آن به میزان ۱۷-۳۳ درصد است که در افراد چاق به ۷۵ درصد می‌رسد. متأسفانه، شیوع این بیماری در افراد با بیماری‌های زمینه‌ای مانند دیابت نوع ۲، بسیار بالا می‌باشد. در حال حاضر تقریباً ۱ میلیارد نفر تحت تأثیرات منفی کبد چرب غیرالکلی قرار گرفته‌اند (۳۹، ۴۱).

از آنجا که چاقی در مطالعات پیشین با کبد چرب غیرالکلی ارتباط زیادی دارد و به نظر می‌رسد تأثیر قابل توجهی بر این بیماری دارد در این مطالعه میزان IL-5 سرم در گروه بیمار بطور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. تیمار رت‌های مبتلا به کبد چرب با آنتی‌اکسیدان‌های بره موم و ویتامین E باعث کاهش معنادار میزان اینترلوکین-۵ گردید و بیشترین کاهش اینترلوکین-۵ در گروه تیمار با بره موم مشاهده گردید. همچنین میزان بیان ژن STAT1 در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که در گروه بیمار افزایش

معناداری نسبت به گروه کنترل در میزان بیان ژن STAT1 دارند. تیمار با ویتامین E و بره موم، بیان ژن STAT1 در رت‌های مبتلا به کبدچرب تیمار شده کاهش معناداری نسبت به گروه بیمار نشان می‌دهند. اثرات ویتامین E در چندین مدل تغذیه‌ای آزمایشی کبد چرب غیرالکلی ارزیابی شده است. در موش‌هایی که با رژیم غذایی کمبود متیونین-کولین (MCD) تغذیه می‌شوند، ویتامین E، استئوپاتیت را تضعیف می‌کند، بعلاوه کاهش آنزیم‌های کبدی و کاهش استئاتوز بافتی و التهاب نکروز نیز مشهود است (۲۱). بیماری کبد چرب غیرالکلی با کاهش محتوای MDA،

در این مطالعه، ارزیابی بافت‌شناسی نشان داد که بره موم بیشترین تأثیر را بر کبد چرب دارد، درحالی‌که ویتامین E تأثیری بر رت‌های مبتلا به کبد چرب نداشتند.

مطالعه Kismet و همکاران نیز در تأیید با یافته‌های این مقاله نشان داد که بره موم باعث کاهش استئاتوز، التهاب لوبولار و کاهش صدمه به هپاتوسیت‌ها در رت‌های مبتلا به کبد چرب می‌شود (۱۳).

تغییرات مولکولی در ارزیابی هر درمانی مهم است، زیرا این تغییرات همان تغییرات اولیه هستند و ارزیابی دقیقتری از اثربخشی درمان را ارائه می‌دهند. تغییر بیان ژن STAT1 در بیماری‌های کبدی و NAFLD از این قاعده مستثنی نیست (۵، ۳۰).

بنابراین ما بیان این ژن را ارزیابی نموده و به ویژه در گروه درمانی ویتامین E تأثیر مثبتی یافته شد. این نتیجه بسیار امیدوار کننده است و احتمال استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها را در مدیریت NAFLD پیشنهاد می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه مطرح نمود که درمان با آنتی-اکسیدان‌های ویتامین E و بره موم، پارامترهای بیوشیمیایی سرم و بافت کبدی را در کبد چرب غیرالکلی بهبود می‌بخشد، بویژه باتوجه به اینکه درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها برای مدیریت کبد چرب غیرالکلی پیشنهاد شده است اما هیچ آنتی‌اکسیدانی برای کاهش همزمان تمام مارکرهای مرتبط شناسایی نشده است؛ بنابراین استفاده از ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌ها همراه با یافتن یک آنتی‌اکسیدان منفرد ممکن است تأثیر قابل قبولی در درمان و پیشگیری از این بیماری در جمعیت با عوامل خطر قابل توجه داشته باشد. در این مطالعه دریافت شد که ویتامین E و بره موم تأثیر مثبتی بر

منجر به کاهش میزان IL-5 در سرم شد، بلکه باعث کاهش میزان بیان ژن STAT1 نیز می‌شود. این تحقیق نشان داد که درمان با دو آنتی‌اکسیدان ویتامین E و بره موم می‌تواند باعث کاهش میزان بیان ژن STAT1 بعنوان عامل مرتبط با پاسخ ایمنی التهابی و پیش-التهابی شود که در کبد چرب بیان این ژن افزایش می‌یابد (۳۷، ۳۸).

با توجه به یافته‌های این مطالعه، بیشترین تأثیر در کاهش میزان بیان ژن STAT1 در تیمار با ویتامین E مشاهده شد.

فلاونوئیدهای موجود در بره موم، آنتی‌اکسیدان‌های بسیار قوی قادر به مهار رادیکال‌های آزاد هستند و در نتیجه از پراکسیداسیون لیپید غشای سلول محافظت می‌کنند. علاوه بر این، بره موم سطح H₂O₂ و NO سلول را کاهش می‌دهد و این امر در اثر ضدالتهابی نقش دارد. بره موم بر بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ بیوشیمیایی در بدن تأثیر می‌گذارد و این در اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مشاهده شده، نقش دارد. در شرایط آزمایشگاهی، بره موم از پراکسیداسیون LDL و نیتراسیون پروتئین جلوگیری و آنزیم NAPDH اکسیداز را مهار می‌کند. در صورتیکه در شرایط *in vivo*، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان ایجاد می‌شود. همچنین، آپوپتوز ماکروفاژ از طریق اثر بر گلوکوتیون و عوامل نکروز تومور/ فاکتور هسته‌ای کاپا B مهار می‌شود (۶).

اثرات بره موم بر بیومارکرهای کبد چرب همچون IL-6 و بیان ژن STAT1 در این مطالعه نیز احتمالاً ناشی از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهندگی پراکسیداسیون لیپیدها طبق مطالعات قبلی بوده است. یافته‌های محققان با نتایج حاصل از این مطالعه مبنی بر سمیت کبدی و صدمات کبدی ناشی از کبد چرب تأیید می‌شود (۱۳).

Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation; Preedy, VR, Patel, VB, Eds. 2018:1-18.

8. Federico A., Dallio M., Masarone M., Gravina A.G., Di Sarno R., Tuccillo C. 2019 Evaluation of the effect derived from silybin with vitamin D and vitamin E administration on clinical, metabolic, endothelial dysfunction, oxidative stress parameters, and serological worsening markers in nonalcoholic fatty liver disease patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 8742075.

9. Hadi H.E., Vettor R., Rossato M. 2018. Vitamin E as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease: reality or myth? *Antioxidants*, 7(1):12.

10. Haghightafard A., Andalib S., Amini Faskhodi M., Sadeghi S., Ghaderi A.H., Moradkhani S. 2018. Gene expression study of mitochondrial complex I in schizophrenia and paranoid personality disorder. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 19(sup3):S133-S146.

11. Ji H.F., Sun Y., Shen L. 2014. Effect of vitamin E supplementation on aminotransferase levels in patients with NAFLD, NASH, and CHC: results from a meta-analysis. *Nutrition*, 30(9):986-991.

12. Jin X.L., Wang K., Li Q.Q., Tian W.L., Xue X.F., Wu L.M. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Chinese propolis during palmitic acid-induced lipotoxicity in cultured hepatocytes. *Journal of Functional Foods*, 34:216-223.

13. Kismet K., Ozcan C., Kuru S., Celemlı O.G., Celepli P., Senes M. 2017. Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90:863-871.

14. Lirussi F., Azzalini L., Orando S., Orlando R., Angelico F. 2007. Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2007(1): CD004996.

بیماری کبد چرب غیرالکلی دارند و ممکن است برای مدیریت بیماران مبتلا به این بیماری استفاده شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل از مطالعه تحقیقاتی و رساله مقطع دکتری رشته فیزیولوژی جانوری می‌باشد که در دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد واحد تهران شمال به انجام رسیده است.

منابع

1. Bai J., Wu L., Chen X., Wang L., Li Q., Zhang Y., Wu J., Cai G., Chen X. 2018. Suppressor of Cytokine Signaling-1/STAT1 Regulates Renal Inflammation in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis Models. *Frontiers in Immunology*, 9:1982.
2. Bellentani S., Scaglioni F., Marino M., Bedogni G. 2010. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases*, 28(1):155-161.
3. Chung M.Y., Yeung S.F., Park H.J., Volek J.S., Bruno R.S. 2010. Dietary α - and γ -tocopherol supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory-related responses in an obese mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(12):1200-1206.
4. Cotter T.G., Rinella M. 2020. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The State of the Disease. *Gastroenterology*, 158(7):1851-1864.
5. Croker B.A., Kiu H., Nicholson S.E. 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Elsevier.
6. Daleprane J.B., Abdalla D.S. 2013. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013:175135.
7. El Hadi H., Vettor R., Rossato M. 2018. Congenital vitamin E deficiency.

- aminotransferase levels and insulin resistance in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(11-12):1553-1561.
23. Oliveira C.P., da Costa Gayotto L.C., Tatai C., Della Nina B.I., Lima E.S., Abdalla D.S., 2003. Vitamin C and vitamin E in prevention of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in choline deficient diet fed rats. *Nutrition Journal*, 2(1):1-5.
24. Perdomo C.M., Frühbeck G., Escalada J. 2019. Impact of nutritional changes on nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 11(3):677.
25. Phung N, Farrell G, Robertson G, George J, editors. Vitamin E but not glutathione precursors inhibit hepatic fibrosis in experimental NASH exhibiting oxidative stress and mitochondrial abnormalities. *Hepatology*; 2001: WB Saunders Co Independence Square West Curtis Center, STE 300, Philadelphia.
26. Podszun M.C., Alawad A.S., Lingala S., Morris N., Huang W.C.A., Yang S. 2020. Vitamin E treatment in NAFLD patients demonstrates that oxidative stress drives steatosis through upregulation of de-novo lipogenesis. *Redox Biology*, 37:101710.
27. Phung N., Pera N., Farrell G., Leclercq I., Hou J.Y., George J. 2009. Pro-oxidant-mediated hepatic fibrosis and effects of antioxidant intervention in murine dietary steatohepatitis. *International Journal of Molecular Medicine*, 24(2):171-180.
28. Ramachandran S., Singh M.K., Mobeen A., Chandra A., Joshi S. 2021. A Meta-analysis of comorbidities in COVID-19 :Which diseases increase the susceptibility of SARS-CoV-2 infection. *Computers in Biology and Medicine*, 130:104219.
29. Renninger M.L., Seymour R.E., Whiteley L.O., Sundberg J.P., HogenEsch H. 2010. Anti-IL5 decreases the number of eosinophils but not the severity of
15. Loguercio C., Andreone P., Brisc C., Brisc M.C., Bugianesi E., Chiaramonte M. 2012. Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9):1658-1665.
16. Mohamed E.H., Baiomy A.A., Ibrahim Z.S., Soliman M.M. 2016. Modulatory effects of levamisole and garlic oil on the immune response of Wistar rats: Biochemical, immunohistochemical, molecular and immunological study. *Molecular Medicine Reports*, 14(3):2755-2763.
17. Mujica V., Orrego R., Pérez J., Romero P., Ovalle P., Zúñiga-Hernández J. 2017. The role of propolis in oxidative stress and lipid metabolism: a randomized controlled trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017:4272940.
18. Murphy S.K., Yang H., Moylan C.A., Pang H., Dellinger A., Abdelmalek M.F. 2013. Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 145(5):1076-1087.
19. Musso G., Gambino R., Cassader M., Pagano G. 2010. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 52(1):79-104.
20. Nagashimada M., Ota T. 2019. Role of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease. *Iubmb Life*, 71(4):516-522.
21. Nan Y.M., Wu W.J., Fu N., Liang B.L., Wang R.Q., Li L.X. 2009. Antioxidants vitamin E and 1-aminobenzotriazole prevent experimental non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44(9):1121-1131.
22. Nobili V., Manco M., Devito R., Ciampalini P., Piemonte F., Marcellini M. 2006. Effect of vitamin E on

36. Soleimani D., Rezaie M., Rajabzadeh F., Gholizadeh Navashenaq J., Abbaspour M., Miryan M. 2021. Protective effects of propolis on hepatic steatosis and fibrosis among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) evaluated by real-time two-dimensional shear wave elastography: A randomized clinical trial. *Phytotherapy Research*, 35(3):1669-1679.
37. Studio del Fegato, Società Italiana di Diabetologia, Società Italiana dell'Obesità Members of the guidelines panel. 2022. Non-alcoholic fatty liver disease in adults 2021: A clinical practice guideline of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF), the Italian Society of Diabetology (SID) and the Italian Society of Obesity (SIO). *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 32(1):1-16.
38. Türkez H., Yousef M.I., Geyikoglu F. 2010. Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10):2741-2746.
39. Willebrords J., Pereira I.V.A, Maes M., Yanguas S.C., Colle I., Van Den Bossche B. 2015. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Progress in Lipid Research*, 59:106-25.
40. Yang J., Fernández-Galilea M., Martínez-Fernández L., González-Muniesa P., Pérez-Chávez A., Martínez J.A. 2019. Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: effects of omega-3 fatty acid supplementation. *Nutrients*, 11(4):872.
41. Zou Y., Li J., Lu C., Wang J., Ge J., Huang Y., 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sciences*, 79(11):1100-1107.
- dermatitis in SHARPIN-deficient mice. *Experimental Dermatology*, 19(3):252-258.
30. Romeo S., Sanyal A., Valenti L. 2020. Leveraging human genetics to identify potential new treatments for fatty liver disease. *Cell Metabolism*, 31(1):35-45.
31. Sato K., Goshō M., Yamamoto T., Kobayashi Y., Ishii N., Ohashi T. 2015. Vitamin E has a beneficial effect on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition*, 31(7-8):923-930.
32. Sepidarkish M., Akbari-Fakhrabadi M., Daneshzad E., Yavari M., Rezaeinejad M., Morvaridzadeh M. 2020. Effect of omega-3 fatty acid plus vitamin E Co-Supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 39(4):1019-1025.
33. Shen X.H., Tang Q.Y., Huang J., Cai W. 2010. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Experimental Biology and Medicine*, 235(1):47-51.
34. Socha P., Horvath A., Vajro P., Dziechciarz P., Dhawan A., Szajewska H. 2009. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48(5):587-596.
35. Soden J.S., Devereaux M.W., Haas J.E., Gumprich E., Dahl R., Gralla J. 2007. Subcutaneous vitamin E ameliorates liver injury in an in vivo model of steatohepatitis. *Hepatology*, 46(2):485-495.

Comparison the Effects of Vitamin E and Propolis on Interleukin-5 and STAT1 Gene Expression in Wistar Rats with Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Saeedeh Barforosh, Maryam Bananaj*, Ramin Hajikhani, Hengameh Ali Beyk

Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a growing health concern worldwide. Unfortunately, scientists have not succeeded in finding a suitable treatment method for this disease, and more research is needed. Studies have shown that treatment with antioxidants is effective in this disease. In this study, the effect of two different antioxidants on NAFLD induced in male Wistar rats was evaluated. This study was conducted on 32 male Wistar rats weighing 200 grams, which were randomly divided into four groups of eight. Mice were fed by gavage with high-fat emulsion at the rate of 2 mg/kg for 40 days. After suffering from fatty liver, the level of interleukin-5 (IL-5) in the serum was measured and also the expression level of STAT1 gene was determined using real-time PCR. The results showed that the level of serum IL-5 in the patient group significantly increased compared to the control group, and the treatment groups with vitamin E and propolis, significantly decreased the level of interleukin-5 compared to the patient group ($p < 0.05$). In addition, the greatest decrease was related to the propolis group ($p < 0.05$). On the other hand, the level of STAT1 gene expression in the fatty liver group is significantly increased compared to the control group ($p < 0.05$); Whereas, after treatment with antioxidants, the expression of this gene decreased ($p < 0.05$). Based on the obtained results, the use of propolis and also vitamin E as natural antioxidants by reducing the inflammatory interleukin and also reducing the expression of genes effective in the formation of NAFLD, have a promising therapeutic role in non-alcoholic fatty liver disease.

Keywords: *STAT1* Gene, IL-5, Propolis, Vitamin E, Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

