View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Simorgh Research Repository

دانشگاه علوم پزشکی

و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته فیزیولوژی پزشکی

عنوان

بررسی اثرات شیلاجیت (Shilajit) بر آسیب های کبد چرب غیر الکلی ناشی از رژیم پرچرب در موش صحرایی نر: بررسی برخی مکانیسم های احتمالی

توسط

باران قزلباش

استاد راهنما

دکتر نادر شاهرخی

اساتید مشاور

دکتر محمد خاکساری حداد | دکتر غلامرضا اسدی کرم | دکتر فیروز قادری پاکدل

شماره ثبت پایان نامه: **(۵۲۳)** **سال تحصیلی(بهمن ۹۸)**

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

فهرست جداول.....ک

فهرست نمودارها.....ل

فهرست تصاویر.....ن

چکیده.....

Table of Contents

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱. مقدمه **Error! Bookmark not defined.**

۱-۲ بیان مسئله، توجیه ضرورت اجرا، سوابق طرح و بررسی متون: **Error! Bookmark not defined.**

۱-۲-۱.اهمیت گیرنده های هسته ای درمتابولیسم چربی ها و پاتوژنز بیماری کبد چرب غیر الکلی : **Error! Bookmark not defined.**

۱-۲-۲. اهمیت آدیپوسیتوکین ها و سیتوکین ها در پاتوژنز بیماری کبد چرب غیر الکلی: **Error! Bookmark not defined.**

۱-۳. هدف اصلی طرح : **Error! Bookmark not defined.**

۱-۴. اهداف جزئی طرح : **Error! Bookmark not defined.**

۱-۵. اهداف کاربردی طرح : **Error! Bookmark not defined.**

۱-۶. فرضیات یا سؤالات پژوهش: **Error! Bookmark not defined.**

فصل دوم: بررسی متون

۲-۱. کبد چرب غیر الکلی **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲. اپیدمیولوژی **Error! Bookmark not defined.**

۲-۳. پاتوفیزیولوژی بیماری کبد چرب **Error! Bookmark not defined.**

۲-۴. علایم بالینی **Error! Bookmark not defined.**

۲-۵. تشخیص بیماری **Error! Bookmark not defined.**

۲-۶. طبقه بندی NAFLD **Error! Bookmark not defined.**

۲-۶-۱.درجه بندی استئاتوز کبدی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۷. درمان بیماری **Error! Bookmark not defined.**

۲-۷-۱. تغییرات سبک زندگی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۷-۲. درمان دارویی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۷-۲-۱. انتی اکسیدان ها : **Error! Bookmark not defined.**

۲-۷-۲-۲. حساس کننده های انسولینی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۷-۲-۳. موارد متفرقه: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۸. اثرات چاقی بر ایجاد کبد چرب: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۹. ارتباط مقاومت انسولینی و ایجاد استئاتوز کبدی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۰. نقش و اهمیت گیرنده های هسته ای درمتابولیسم چربی ها و پاتوژنز بیماری کبد چرب غیر الکلی : **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۱. نقش و اهمیت آدیپوسیتوکین ها و سیتوکین ها در پاتوژنز بیماری کبد چرب غیر الکلی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۲. مکانیسم ایجاد التهاب و نقش ان در ایجاد بیماری کبد چرب غیر الکلی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۳. مکانیسم فیبروز: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۳-۱. پیشرفت NASH به سیروز: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۴. هموئوستاز نرمال انرژی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۵. مکانیسم تنظیمی مسیرهای متابولیکی در بافت چربی و کبد: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۶. نقش و اهمیت فاکتور های رونویسی واسط در اثرات سیتوکین ها و هورمون ها: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۷. ارتباطات مکانیسم های تنظیم کننده سیستمیک و موضعی میانجی های متابولیسم: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۸. نقش و اهمیت مقاومت به انسولین و اثرات ان بر هموئوستاز انرژی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۸-۱. اثرات و اهمیت متابولیکی مقاومت به انسولین: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۸-۲. نقش و اهمیت سنتز تری گلیسیرید و ایجاد استئاتوز در کبد: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۸-۳. نقش و اهمیت خروج تری گلیسیرید در کبد و ایجاد استئاتوز کبدی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۹. پاتوژنز استئاتوهپاتیتَ **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۰. نقش استرس اکساید ها در بیماری کبد چرب غیر الکلی: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۱. شیلاجت: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۱-۱. منشا شیلاجیت: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۱-۲. ترکیبات مولکولی شیلاجیت: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۱-۳. خواص درمانی شیلاجیت: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۱-۴. خواص انتی اکسدانی شیلاجیت: **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۲. اثرات ضد التهابی شیلاجیت **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۴. اثرشیلاجیت بر تقویت یادگیری و حافظه **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲۵. ایمنی مصرف شیلاجیت **Error! Bookmark not defined.**

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱. مواد و دستگاههای مورد استفاده در مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۳-۲. گروه بندی حیوانات **Error! Bookmark not defined.**

دیاگرام پروتکل تحقیق: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۳. بافرها و محلولهای مورد استفاده: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴. روش های استفاده شده در پژوهش : **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴-۱. پروتکل القای کبد چرب غیر الکلی: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴-۲. تجویز شیلاجیت : **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴-۳. تهیه و جمع آوری نمونه ها: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴-۴. روش تهیه شیلاجیت : **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴-۵. روش بررسی وضعیت هیستوپاتولوژی کبد: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴-۶. بررسی میزان آنزیم های اکسیداتیوی کبدی و آنزیم های کبدی و HOMA-R: **Error! Bookmark not defined.**

۳-٤-۷. خلاصه انجام بررسی میزان MDA: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۵. روش الایزا جهت بررسی میزان انسولین و سایتوکین ها و ادیپوکین های **Error! Bookmark not defined.**

۳-۵-۱. مراحل الایزا انجام شده بر اساس پروتکل توصیه شده کیت های مورد استفاده: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۶. روش انجام وسترن بلات : **Error! Bookmark not defined.**

۳-۶-۳. مینی الکتروفورز عمودی: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۶-۴. الکترو ترانسفر: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۷. بررسی میزان سیالیت غشای میتوکندری: **Error! Bookmark not defined.**

۳-۸. روش محاسبه حجم نمونه و تعداد آن : **Error! Bookmark not defined.**

۳-۹. روش محاسبه داده ها، روش تجزیه و تحلیل داده ها برای رسیدن به اهداف طرح: **Error! Bookmark not defined.**

فصل چهارم: نتایج

۴-۱. تغییرات نسبت وزنی کبد به وزن توتال در گروه های مورد مطالعه . **Error! Bookmark not defined.**

۴-۲. بررسی تغییرات ماکروسکوپی بافت کبد بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۲. بررسی تغییرات ماکروسکوپی بافت کبد بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

بررسی تغییرات میکروسکوپی (هیستولوژیکی) بافت کبد بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۳. تغییرات میزان سرمی HOMA.IR، FBS بین گروه های مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۴. مقایسه میزان TG سرم بین گروه های مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۵. مقایسه میزان TC سرم بین گروه های مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۶. مقایسه میزان HDL-C سرم بین گروه های مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۷. مقایسه میزان LDL-C سرم بین گروه های مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۸. مقایسه میزان VLDL سرم بین گروه های مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۹. مقایسه میزان ALT. AST سرم بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۰. بررسی میزان مالون دیالدهید در بافت کبد گروه های مورد مطالعه: **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۱. بررسی میزان فعالیت انزیم SOD در بین گروه های مورد مطالعه: **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۲. بررسی تغییرات میزان فعالیت انزیم GPx در گروه های مورد مطالعه: **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۳. بررسی میزان سیالیت غشای میتوکندری(Viscosity ، Polarization) در بافت کبدی بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۴. نتایج اندازه گیری و مقایسه میزانβ IL 1 سرم خون بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

Error! Bookmark not defined. Sensitivity : 10.83pg/L.

۴-۱۵. مقایسه میزان IL 6 سرم خون بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۶. مقایسه میزان TNF-α سرم خون بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۷. مقایسه میزان IL-10 سرم خون بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۱۸. مقایسه میزان آدیپونکتین سرم خون بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

Error! Bookmark not defined. Sensitivity : 2.52pg/ml

۴-۱۹. مقایسه میزان رزیستین سرم خون بین گروه های مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۲۰. مقایسه میزان بیان پروتئین گیرنده هسته ای(Peroxisome proliferator-activated receptor) آلفا PPRA در بافت کبدی بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۴-۲۱. مقایسه میزان بیان پروتئین گیرنده هسته ای(Peroxisome proliferator-activated receptor) گاماPPRA در بافت کبدی بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱. اثرات رژیم غذایی پر چرب در ایجاد کبد چرب غیر الکلی و بررسی تاثیر شیلاجیت در کاهش علایم هیستولوژیکی و بیوشیمایی بر آن.**Error! Bookmark not defined.**

۵-۲. تغییرات میزان GSH، MDA و SOD کبدی بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۵-۳. تغییرات سیالیت غشای میتوکندری در بافت کبدی بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۵-۴. تغییرات میزانTNF-α, IL 6 , IL 10 β,IL1 سرم خون بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۵-۵. تغییرات میزان ادیپونکتین و رزیستین، سرم خون بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۵-۶. تغییرات میزان بیان پروتئین گیرنده هسته ای PPRAآلفا و گاما در بافت کبدی بین گروه های مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

۵-۷. بررسی اثرات خوراکی شیلاجیت با اثرات تزریق داخل صفاقی و دوز کم و زیاد شیلاجیت. **Error! Bookmark not defined.**

۵-۸. نتیجه گیری: **Error! Bookmark not defined.**

۵-۹. نتیجه گیری کلی: **Error! Bookmark not defined.**

۵-۱۰. پیشنهاد ها: **Error! Bookmark not defined.**

فهرست منابع **Error! Bookmark not defined.**

پیوست ها **Error! Bookmark not defined.**

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۳: مواد مورد استفاده در مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

جدول۲-۳: دستگاههای مورد استفاده در مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۱-۴ :تغییرات نسبت وزن کبد به وزن حیوان در گروه های مورد مطالعه.....
Error! Bookmark not defined.

نمودار ۲-۴: اثر تغذیه پر چرب بر میزان تجمع چربی در هپاتوسیت ها بر اساس اسکور(Grade) (A) و مقایسه میزان استئاتوزیس سلول های کبدی (B)درگروه های مورد مطالعه:..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۳-۴: تغییرات FBS (A) و HOMA-IR (B) در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۴:تغییرات میزان تری گلیسرید و کلسترول سرم خون با تغذیه رژیم غذایی پر چرب در بین گروه های مورد مطالعه:..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۵-۴: تغییرات میزان کلسترول سرم خون با تغذیه رژیم غذایی پر چرب در بین گروه های مورد مطالعه:..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۶-۴: تغییرات میزان HDL سرم خون با تغذیه رژیم غذایی پر چرب در بین گروه های مورد مطالعه:..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۷-۴: تغییرات میزان LDL سرم خون در بین گروه های مورد م طالعه:..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۸-۴: تغییرات میزان VLDL سرم خون درگروه های مورد مطالعه:..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۹-۴. تغییرات انزیم های کبدی در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۰-۴: تغییرات MDA در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۱-۴: تغییرات میزان فعالیت SOD در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۲-۴: تغییرات میزان فعالیت GPx در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۳-۴: تغییرات ویسکوزیته و پلاریزاسون غشای میتوکندری در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۱۴ :تغییرات سرمی βIL 1 در گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۱۵: تغییرات سرمی IL 6 در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۱۶: تغییرات TNF-α سرمی در بین گروه های مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۱۷: تغییرات IL-10 ســـرمی با تغذیه رژیم پر چرب به مدت ۱۲ هفته در بین گروه های مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۱۸: تغییرات آدیپونکتین ســـرمی بعد از تغذیه رژیم پر چرب به مدت ۱۲ هفته در بین گروه های مورد مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۱۹: تغییرات رزیســـتین ســـرمی بعد از تغذیه رژیم پر چرب به مدت ۱۲ هفته در بین گروه های مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۲۰: تغییرات بیان پروتین گیرنده هســـته ای PPAR-α بافت کبد بعد از تغذیه رژیم پر چرب به مدت ۱۲ هفته در بین گروه های مطالعه ..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۲۱: تغییرات بیان پروتین گیرنده هسته ای PPAR گاما بافت کبد بین گروه های مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۳. دیاگرام پروتکل تحقیق ..... Error! Bookmark not defined.

شکل ۲-۳. پلیت های غذایی پر چرب تهیه شده در پروژه ..... Error! Bookmark not defined.

شکل ۳-۳. فریزر ۷۰- استفاده شده (INNOVA U 101) ..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۴-۳. نمونه شیلاجیت تهیه شده به صورت خالص جهت استفاده در مطالعه..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۵-۳. کیت ها ی **(**ZeLL Bio ,Germa) استفاده شده برای انالیز میزان فعالیت انزیمی SOD و GPX و دستگاه الایزا ریدر (از سمت چپ به راست به ترتیب) ..... Error! Bookmark not defined.

شکل ۶-۳. دستگاه اتوانالیزور GT 3000 جهت انالیز سرم خون از نظر ,HDL, TG. CHL. LDL, FBS, ALT. AST ..... Error! Bookmark not defined.

شکل ۷-۳. ساندویچ الایزای غیرمستقیم ..... Error! Bookmark not defined.

شکل ۱-۴. بررسی ماکروسکوپی بافت کبد در گروه های مورد مطالعه..... Error! Bookmark not defined.

شکل ۲-۴. نمونه لام بافت کبدی رنگ امیزی شده با ائوزین ـــ هماتوکسیلین گروه های مورد مطالعه جهت بررسی میزان استئاتوزیس سلول های کبدی..... Error! Bookmark not defined.

پیوست ها

عنوان **صفحه**

پیوست شماره ۱: فهرست مقالات چاپ شده ۱۳۲

پیوست شماره ۲: برگه ایمنی اکریل آمید ۱۳۳

فهرست کوتاه نوشته ها

Abbreviations	
ALT	Alanine aminotransferase
AMP	Adenosine monophosphate
AST	Aspartate aminotransferase
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
ChREBP	Carbohydrate responsive element-binding protein
CTscan	Non-contrast computed tomography
DNL	De novo lipogenesis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FFA	Free fatty acid
GLUT-4	Glucose transporter type 4
GPX	Gglutathione peroxidase

H.Sh	High dose of shilajit groups
HDL	High-density lipoprotein
HFD	High Fat Diet
HOMA-IR	Homeostasis model of insulin resistance index
IL	Interleukin
IP	Intraperitone
L.Sh	Low dose of shilajit groups
LCPUFA n-3	n-3 Long chain polyunsaturated fatty acids
LDL	Low-density lipoprotein
LXR	Liver X receptor
MAPKs	A mitogen-activated protein kinase
MDA	Malondialdehyde
MRI	Magnetic resonance imaging
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
OD	optical density
P	Fluorescent polarization
PBS	Phosphate-buffered saline
Pio	Pioglitazone group
Po	per oral
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor

PVDF	Polyvinylidene difluoride
ROS	Reactive oxygen species
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SOD	Superoxide dismutase
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TC	Total cholesterol
TG	Triglycerides
TNF-α	Tumor necrosis factor
TZDs	Thiazolidinediones
VLDL	Very low-density lipoprotein

چکیده:

مقدمه و اهداف: بیماری کبدی چربی غیرالکلی (NAFLD) یکی از علت های شـایع بیماری مزمن کبدی اسـت که همراه با چاقی و دیابت رخ میدهد، شـیوع این بیماري در افراد بالغ در جوامع غربی ۳٤ تا ٤٦ درصـد گزارش شده است. علت کبد چرب غیر الکلی به طور کامل شناخته شده نمی باشد. مقاومت به انسولین، چاقی، اسـترس اکسـیداتیو و آبشـارهای التهابی نقش مهمی را در ایجاد و پیشـرفت بیماری ایفا می کنند. شـیوع بالا و ماهیت مزمن این بیماري، کیفیت زندگی افراد را تحت تاثیر قرار می دهد و هزینه های سـنگین اقتصـادي را بر جامعه تحمیل می کند. با توجه به نقش اسـترس اکسـیداتیو و عوامل التهابی و سـطوح پایین عوامل انتی اکسیدانی و ضد التهابی در بیماری کبد چرب ، موجب توجه رو به رشد محققین در استفاده از انتی اکسیدان ها و ضـد التهاب ها در درمان این بیماران شـده اسـت با توجه به اینکه ماده شـیلاجیت فعالیت انتی اکسـیدانی و ضـد التهابی بالایی دارد، لذا هدف از این مطالعه بررسـی اثر ات احتمالی شـیلاجیت بر آسـیب های کبدی ناشـی از NAFLD و بررسی برخی مکانیسم های احتمالی معطوف می باشد.

روش تحقیق: در این مطالعه۷۲ سر موش صحرایي نر نژاد ویستار با وزن ۱۵۰-۲۰۰ گرم و بعد از یک هفته سازش با محیط حیوان خانه که به طور تصادفی به ۹ گروه با ۸ سر در هر گروه استفاده شده است: گروه کنترل (رژیم استاندارد)، گروه sham -vehicle(Gavage) (کبد چرب + حلال بصورت گاواژ)، گروه sham -vehicle(I.P) (کبد چرب + حلال تزریق داخل صفاقی) ،گروه L.Sh(Gavage) (کبد چرب + شیلاجیت بصورت گاواژ با دوز کم)، گروه H.Sh(Gavage) (کبد چرب + شیلاجیت بصورت گاواژ با دوز بالا)، گروه پیوگلیتازون (کبد چرب+ داروی پیوگلیتازون خوراکی)، گروه داروی پیوگلیتازون + شیلاجیت بصورت گاواژ ، گروه L.Sh(I.P)(کبد چرب + تزریق داخل صفاقی شیلاجیت با دوز کم) ، گروه H.Sh(I.P) (کبد چرب + تزریق داخل صفاقی شیلاجیت با دوز بالا).

تجویز شیلاجیت خوراکی به مدت دو هفته و تجویز داروی پیوگلیتازون و تجویز شیلاجیت داخل صفاقی به مدت یک هفته بعد از القای کبد چرب با رژیم پر چرب به مدت ۱۲ هفته انجام شد. سطح سرمی AST، ALT، TG، TC، LDL، VLDL، گلوکز و میزان فعالیت GPx و SOD، سطوحMDA دربافت کبد و وزن و هیستوپاتولوژیک بافت

کبدی ارزیابی شد. سطح سرمی IL-1β، IL-6، TNF-α، IL-10، آدیپونکتین، رزیستین و میزان بیان پروتئین گیرنده های هسته ای PPAR آلفا و گاما و همچنین میزان سیالیت غشای میتوکندری ،در بافت کبد بررسی گردید.

یافته ها: نتایج بدست امده بیانگر افزایش انزیم های کبدی(AST,ALT) و افزایش میزان HOMA-IR. FBS,LDL,VLDL,TG.TC و کاهش HDL در گروه حلال می باشد که این تغییرات در گروه های درمانی شیلاجیت تعدیل گردید. مطالعات بافتی نیز نشان داد که در گروه حلال القای کبد چرب با ایجاد استئاتوزیس با گرید ۳ و ارتشاح سلول های لنفوسیتی و بالونینگ همراه بود که در گروه های درمانی شیلاجیت این تغییرات به طور معنی داری کاهش و بهبود یافته است ($p<0.05$). میزان MDA بافت کبدی در گروه های حلال در مقاسیه با کنترل افزایش یافت و همچنین میزان فعالیت SOD وGPx بافت کبد در گروه حلال به ترتیب کاهش و افزایش معنی داری در مقایسه با کنترل دارد که در گروه های درمانی این تغییرات تعدیل یافته اند($p<0.001$).

در بررسی های مولکولی نتایج نشان داد که در گروه حلال سطح سرمی ، IL-1β، IL-6 و TNF-α افزایش یافت؛ برعکس، سطح IL-10 در گروه حلال در مقایسه با کنترل کاهش یافت . درگروه های دریافت کننده شیلاجیت و پیوگلیتازون در مقایسه با گروه حلال این تغییرات، به استثنای تغییرات IL-6 تعدیل یافته است که از نظر اماری معنی دار بودند($p<0.05$). همچنین سطوح سرمي آدیپونکتین و رزیستین در گروه حلال نسبت به گروه کنترل به ترتیب کاهش و افزایش معني داري یافت که این تغییرات در گروه های درمانی نسبت به گروه حلال تعدیل یافت($p<0.05$). میزان سیالیت غشای میتوکندری در گروه حلال کاهش معنی داری($p<0.05$) در مقایسه با گروه کنترل دارد که این تغییرات در گروه های درمانی اختلاف معنی داری با گروه حلال نداشت. میزان بیان پروتئین گیرنده ,PPAR- α وPPAR-γ در گروه حلال کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشت. بیان این گیرنده در گروه درمانی شیلاجیت در مقایسه با گروه حلال افزایش معنی داری داشت ($p<0.05$).

بحث و نتیجه گیري: نتایج نشان دادند که رژیم غذایی پر چرب در مدت حداقل ۱۲ هفته موجب القای کبد چرب غیر الکلی گردید، بطوریکه موجب بالا رفتن انزیم های کبدی وتغییرات استئاتوزیس هپاتوسیت ها و تغییر پروفایل لیپیدی شد. همچنین نتایج نشان دهنده تغییرات سرمی سایتوکین ها و ادیپوکین ها و تغییرات سیالیت

غشایی میتوکندری وهمچنین در سطح مولکولی موجب تغییرات بیان گیرنده های هسته PPARαگردید. در این مطالعه نشان داده شد که تجویز شیلاجیت می تواند اثرات درمانی در تعدیل تغییرات ایجاد شده در کبد چرب غیر الکلی داشته باشد که احتمالا از طریق اصلاح تعادل سیتوکین ها و ادیپوکین ها و بیان گیرنده هسته ایPPARαو نیز رفع علایم و اسیب های ناشی از رژیم پر چرب مثل اصلاح تغییرات پروفایل لیپیدی، مقاومت به انسولین، اصلاح قند خون و رفع علائم استئاتوزیس هپاتوسیت ها رخ داده باشد. اثرات فیزیولوژیکی بارز شیلاجیت مربوط به وجود دی بنزو آلفا پیرونز به همراه اسید هیومیک و فولویک می باشد که در مطالعات متعدد اثرات این مواد موثره در مسیر های انتی اکسیدانی و ضد التهابی گزارش و تایید شده است. مکانیسم های سلولی درگیر در این اثرات نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

کلمات کلیدي: کبد چرب غیر الکلی ، شیلاجیت، ادیپوکین،سیتوکین ، گیرنده های هسته ای کبدی PPARα،PPAR- γ ، موش صحرایی.

Abstract:

Introduction and goals: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the common causes of chronic liver disease, which occurs with obesity and diabetes. The prevalence of this disease in adult populations in Western societies is 34 to 46 percent. The pathogenesis of the non-alcoholic fatty liver is not fully known. Insulin resistance, obesity, oxidative stress and inflammatory cascade play roles in the development of the disease. The high prevalence and chronic nature of the disease affects people's quality of life and imposes heavy burdens on the community. Regarding the role of oxidative stress and inflammatory factors in the pathogenesis of this disease and low levels of antioxidant and anti-inflammatory activity in people with fatty liver, it increases the attention of researchers to the use of antioxidants and anti-inflammatory drugs in the treatment of these patients. Due to the high level of anti-oxidant and anti-inflammatory activity, the purpose of this study was to investigate the possible effect of Shilajit, as Ayurvedic drug, on liver damage induced by NAFLD and its possible mechanisms.

Methods: In this study, 72 male Albino rats weighing 150-200 grams after one week of adaptation to the animal environment were randomly divided into 9 groups of 8 rats in each group for study: control (Standard diet), sham-vehicle (po) (NAFL + gavage of solvent), sham-vehicle (ip) (NAFL + intraperitoneal injection of solven), L.Sh (po) (NAFL + gavage of Shilajit in Low dose), H.Sh (po) (NAFL+ gavage of Shilajit in high dose), Pio group (NAFL +gavage of pioglitazone), MIX group (NAFL +Pioglitazone + gavage of Shilajit), L.Sh (ip) (NAFL + intraperitoneal injection of Shilajit in Low dose), H.Sh (ip) (NAFL + intraperitoneal injection of Shilajit in high dose). Gavage

of Shilajit was administered for two weeks. Pioglitazone and intraperitoneal treatment of Shilajit were performed for one weeksfor after induced fatty liver by feeding high-fat diet for 12 weeks. Serum levels of AST, ALT, TG, TC, LDL, VLDL, glucose, and activity levels of GPx and SOD, MDA levels in liver tissue and weight and histopathologic effects of liver tissue were measured. Also, the amount of fluidity of the mitochondrial membrane of hepatocytes, the levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10, adiponectin, resistin and the level of expression of the PPAR alpha and gamma receptor protein in the liver tissue were investigated.

Results: The results showed increased levels of liver enzymes (AST, ALT) and increased levels of FBS, LDL, VLDL, TG.TC.HOMA-IR and HDL reduction in the sham group, which were modulated in the Shilajit groups. Histological studies also showed that, in the sham group, fatty liver induction was associated with the formation of grade 3 steatosis and infiltration of lymphocyte and hepatocytes ballooning, which has been significantly reduced and improved in the Shilajit therapy groups ($p < 0.05$). In the sham-solvent groups in comparison to control MDA levels of liver tissue increased and also the activity of SOD and GPx in the liver tissue significantly decreased and increased, respectively. These modifications have been moderated in the treatment groups ($P < 0.001$). In the molecular studies, the results showed that in the sham group, serum levels, IL-1β, IL-6 and TNF-α increased in comparison with the control group; on the contrary, the level of IL-10 in sham group decreased compared with control. In the groups receiving Shilajit and pioglitazone compared to the sham group, these changes, exception to IL-6, have been moderated and this moderation was statistically significant ($p < 0.05$). Serum levels of adiponectin and resistin in the

sham group also decreased and increased significantly, respectively in the sham group compared with the control group, which was moderated in the treatment groups compared to the sham group ($p < 0.05$). The results of this study showed that the fluidity of the sham group significantly decreased ($p < 0.05$) compared to the control group, which showed no significant difference in the treatment groups compared to the sham group. In Western blot studies in the liver tissue, it was observed that, the PPARαreceptor expression in the sham group was significantly reduced compared to the control group. The expression of this receptor in the Shilajit group was significantly increased compared to the sham group ($P < 0.05$). Also the expression of PPAR-γreceptor in the Shilajit group was significantly increased compared to the sham group ($P < 0.05$).

Discussion and conclusion : The results showed that a high-fat diet in the course of at least 12 weeks could induce non-alcoholic fatty liver by increasing liver enzymes and inducing steatosis in the hepatocytes and lipid profile changes. Also, the results indicate the changes in serum cytokines and adipokines, and changes in mitochondrial membrane fluidity, as well as in the molecular level, alter the expression of the PPARαand, PPAR-γreceptor expression. In this study, it has been shown that prescribing Shilajit can have therapeutic effects in modulating the changes in non-alcoholic fatty liver by modifying the balance of cytokines and adipokines and expressing the PPARαand, PPAR-γreceptor receptor, as well as eliminating symptoms and harm caused by Fatty diets like changes in the mitochondrial membrane fluidity and correction of lipid profiles, insulin resistance, blood glucose modification and hepatocyte osteotomy symptoms. Significant physiological effects of Shilajit are related to the presence of di-benzo-a-pyrene with humic and fulvic acid, which has been

reported in numerous studies on the effects of these active substances in anti-oxidant and anti-inflammatory routes. The cellular mechanisms involved in these effects require further research.

Key words: non-alcoholic fatty liver, Shilajit, pioglitazone, adipokine, cytokine, PPARαand PPAR-g, rat

KERMAN UNIVERSITY

OF MEDICAL SCIENCE

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree PhD

Title

The investigation of Shilajits effects in non alcoholic fatty liver injuries induced by investigation of some possible mechanisms .rats :diet in male Rat high fat

By

Baran Ghezelbash

Supervisor

Nader Shahrokhi

Advisors

1- Dr. Mohammad Khaksari Haddad 2-Dr. Firoze Ghaderi Pakdel

3- Dr. Gholamreza Asadikaram

Thesis No : **(524)** Date : **(February, 2020)**

تاریخ: ۹۸/۱۱/۲۸
شماره: ۹۹۳۵۸۱
کد اخلاق: IR.KMU.REC.1396.681

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی خانم **باران قزلباش** دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته **فیزیولوژی پزشکی** دانشکده **پزشکی** دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان" بررسی اثرات مومیایی(Shilajit) بر آسیب های کبد چرب غیر الکلی ناشی از رژیم پرچرب در موش صحرایی نر: بررسی برخی مکانیسم های احتمالی " درساعت 12 ظهر روز دوشنبه مورخ **98/11/28** با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استاد راهنما	1-جناب آقای دکتر نادر شاهرخی	
ب: استادان مشاور	1-جناب آقای دکتر غلامرضا اسدی کرم 2-جناب آقای دکتر محمد خاکساری 3-جناب آقای دکتر فیروز قادری باکدل	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر علی سعید پور	
ح: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر غلامرضا سپهری	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر رضا خیرالدیش	
ذ: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر سعید اسماعیلی ماهانی	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	سرکار خانم دکتر حمیده پشیری	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۱۹/۷۹ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی افضلی پور