

بررسی اثرات تیمول بر کبد چرب غیر الکلی ناشی از استرس بی حرکتی مزمن در موش صحرایی

سمیه میری^۱، غلامرضا کمیلی^{۲*}، عباسعلی نیازی^۲، محمدرضا شهرکی^۱

^۱گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران، ^۲گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: تیمول یک مونوترپن فنولی است که در پژوهش‌های قبلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی آن گزارش شده و به نظر می‌رسد که نقش محافظتی برای کبد در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد را داشته باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات تیمول بر کبد چرب غیرالکلی ناشی از استرس بی حرکتی مزمن در موش صحرایی بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، ۲۴ سر موش صحرایی نژاد ویستار وارد مطالعه شدند و به ۳ گروه مساوی شامل؛ شم کنترل، کنترل منفی و درمان (دریافت کننده تیمول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. بعد از ۶۰ روز موش‌ها با کتامین و زایلازین بیهوش و خون‌گیری از قلب انجام و کل کبد برای بررسی‌های بافت‌شناسی برداشته شد. میزان فاکتورهای التهابی شامل IL-6 و TNF- α ، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل: GPx، SOD و کاتالاز، پروفایل چربی شامل LDL، HDL، تری‌گلیسرید و کلسترول تام و هم‌چنین مالون دی‌آلدهید (MDA) مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که در گروه کبد چرب میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاهش و فاکتورهای چربی و میزان MDA افزایش یافت. در حالی که تیمار با تیمول توانست این فاکتورها را به حالت نرمال نزدیک کند. نتایج حاصل از پاتولوژی نشان داد که تیمول می‌تواند با کاهش نکروز سلولی میزان آسیب ایجاد شده در کبد چرب غیر الکلی را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: بررسی‌های صورت گرفته در پژوهش ما نشان داد که تیمول می‌تواند با خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث بهبود عملکرد کبد چرب غیرالکلی ناشی از استرس بی حرکتی مزمن از طریق کاهش شاخص‌های التهابی، افزایش ایندکس‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش نکروز سلولی شود.

واژه‌های کلیدی: تیمول، کبد چرب غیرالکلی، استرس بی‌حرکتی مزمن

*نویسنده مسئول: غلامرضا کمیلی، زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، گروه فیزیولوژی

Email: rkomeili@gmail.com

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یکی از شایع‌ترین انواع بیماری کبد در جهان است و به عنوان یک سندرم متابولیک کبدی در نظر گرفته شده است (۱). کبد چرب غیرالکلی در اثر تجمع تری‌گلیسریدها در سلول‌های کبدی شکل می‌گیرد، افزایش اسیدهای چرب آزاد در کبد عمدتاً از طریق سه عامل؛ لیپولیز در بافت چربی، رژیم غذایی پرچرب و لیپوژن مجدد حاصل می‌شود (۲ و ۳). افزایش نفوذ چربی در کبد، سبب کاهش تولید پیش‌سازهای انرژی در آن (کاهش گلوکونئوژن و اثرات مختلف روی بتا اکسیداسیون چربی‌ها و کتوژن) و افزایش لیپوژن در این عضو می‌شود. در کبد چرب تغییرات عمیق در اعمال هپاتوسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها اتفاق می‌افتد. از برجسته‌ترین اختلالاتی که مشاهده می‌شود وقفه گلوکونئوژن و افزایش لیپولیز در بافت چربی می‌باشد. کبد چرب سبب تغییر حساسیت بافت چربی و پانکراس به هورمون‌ها می‌شود (۳). تجمع چربی در کبد می‌تواند در اثر عواملی چون افزایش سنتز چربی، کاهش دفع چربی و یا کاهش بتا اکسیداسیون آن به وجود آید (۴).

بیماری کبد چرب در مردان شایع‌تر از زنان است و در زنان بعد از سن یائسگی شیوع آن افزایش می‌یابد (۵). یکی از مهم‌ترین فرضیه‌هایی که بیان‌کننده علت ایجاد بیماری است تئوری دو مرحله‌ای نام دارد که در آن مقاومت به انسولین به عنوان عامل استئاتوز و استئاتو هپاتیت و عوامل اکسیداتیو به عنوان عامل التهاب و پیشرفت بیماری بیان شده‌اند (۶).

افزایش فعالیت آنزیم‌های شاخص عملکرد کبد از قبیل؛ ALT، AST و ALP در سرم نشانگر آسیب کبدی می‌باشد. ALT که باعث تبدیل آلانین به پیرووات و گلوتامات می‌شود، اختصاصی‌تر بوده و شاخص مناسب‌تری برای تشخیص آسیب در بافت کبد می‌باشد (۷).

با توجه به نقش استرس اکسیداتیو بر بیماری کبد چرب غیرالکلی و تغییر پروفایل‌های لیپیدی، امروزه پژوهش‌هایی در مورد اثر آنتی‌اکسیدانی گیاهان و میوه‌ها بر شاخص‌های بیوشیمی این بیماری صورت گرفته است. ترکیب‌های پلی‌فنولی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. این ترکیبات به ویژه فلاونوئیدها اثر حفاظتی بر کبد در برابر آسیب‌های ناشی از سموم کبدی و رادیکال آزاد دارند (۸). تیمول یک مونوترپن فنولی است که دارای ۳ گروه؛ متیل، یک حلقه بنزنی و یک گروه هیدروکسیل با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}$ می‌باشد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (۹). گیاهان مختلفی دارای تیمول می‌باشند که مهم‌ترین آنها آویشن و زنیان می‌باشد (۱۰). پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که تیمول از طریق مهار $TNF-\alpha$ و $IL-6$ باعث بروز اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۱۱). همچنین اثرات حفاظتی تیمول در برابر عوامل آسیب‌رسان و اکسیدان‌ها در پژوهش‌های مختلفی نشان داده شده است (۱۲-۱۴).

با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی گزارش شده در مورد تیمول در پژوهش‌های مختلف، در این مطالعه سعی شد اثرات تیمول بر بهبود علائم بیماری کبد چرب غیرالکلی ناشی از استرس مزمن بی‌حرکتی مورد مطالعه قرار گیرد. ایجاد مدل حیوانی کبد چرب غیرالکلی و مطالعه عوامل مؤثر بر آن یکی از راه‌های مهم بررسی اثرات داروهای مختلف بر این بیماری است. رژیم پرچرب نه تنها در انسان‌ها بلکه در حیوانات آزمایشگاهی نیز می‌تواند باعث ایجاد چاقی، افزایش آنزیم‌های کبدی و اختلال در پروفایل‌های لیپیدی، ایجاد التهاب و استئاتوز بافت کبد شود. یکی از عوامل خطر ساز اصلی همراه با کبد چرب غیرالکلی، چاقی و اضافه وزن است (۱۲). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات تیمول بر کبد چرب غیرالکلی ناشی از استرس بی‌حرکتی مزمن در موش صحرایی بود.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، جامعه مورد مطالعه شامل ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۲ الی ۱۴ هفته با وزن ۱۳۰ الی ۱۵۰ گرم بود. موش‌ها به صورت تصادفی انتخاب شدند و یک هفته قبل از شروع آزمایش، در اتاق حیوانات با دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد با تهویه مناسب و رطوبت 15 ± 45 درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌هایی از جنس پلکسی با درهای

توری نگه داری شده و پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه جهت انجام آزمایشات مورد مطالعه قرار گرفت. در کلیه مراحل پژوهش، اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

در گروه بندی حیوانات، موش‌ها به طور تصادفی به ۲ گروه ۸ تایی به شرح ذیل تقسیم شدند؛ کنترل: گروهی که مداخله انجام نشد، استرس: گروهی که تحت استرس بی‌حرکتی بودند و استرس + تیمول: حیواناتی که علاوه بر این که تحت استرس بی‌حرکتی بودند، تیمول را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم و با حجم تزریق ۳ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

موش‌های صحرایی تحت استرس بی‌حرکتی روزانه به مدت ۶ ساعت در یک مقید کننده^(۱) به مدت ۶۰ روز قرار گرفتند. بعد از ۶۰ روز موش‌ها با کتامین و زایلازین بیهوش شده و خون‌گیری انجام شد. کل کبد برای بررسی‌های بافت‌شناسی برداشته شد. به این صورت که نصف آن ثابت شده در ۱۰ درصد فرمالین و برای تعبیه پارافین پردازش گردید. بقیه کبد در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تحلیل و بررسی بیوشیمی بیشتر ذخیره شد. نمونه کبد پس از ۴۸ ساعت نمونه‌ها به بخش پاتولوژی ارسال شده و در بخش پاتولوژی برش‌های ۲ میکرونی تهیه و با رنگ‌های هماتوکسیلین انوزین و تری کروم رنگ‌آمیزی شده و به وسیله پاتولوژیست شدت

1- Restrainer

نانومتر خوانده شد. با رسم منحنی استاندارد، غلظت‌ها گزارش گردید (۱۳).

در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های کبدی با بافر پیروفسفات سدیم، متوسولفات فنازین و نیترو بلاک ترازولیوم (NBT) آغاز گردید. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگ‌زای تشکیل شده در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه تعیین گردید (۱۶ و ۱۵).

اندازه‌گیری فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت‌های شرکت Zell bio انجام شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای التهابی با استفاده از کیت‌های شرکت Zell bio انجام شد.

نمونه سرم به آزمایشگاه ارسال شد و تمامی موارد ذکر شده با دستگاه هیتاشی ژاپن اندازه‌گیری شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی و تجزیه و من - ویتنی تحلیل شدند.

تغییرات کبدی درجه‌بندی^(۱) شد که این درجه بندی بر اساس جدول مندler^(۲) می‌باشد (۱۳).

فعالیت آنزیم کاتالاز بر مبنای تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) اندازه‌گیری شد. واکنش با اضافه کردن ۳۰ میلی‌مولار H_2O_2 به حجم مناسبی از سرم در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) شروع شد. سپس جذب طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرایت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (۱۴).

مالون دی آلدئید بر اثر واکنش با TBA، کمپلکس صورتی رنگی ایجاد می‌کند که می‌توان از اندازه‌گیری آن به میزان پراکسیداسیون لیپیدی پی برد. طول موج کاربردی آن ۵۳۲ نانومتر می‌باشد. جهت انجام این تست در مرحله نخست، هموژن ۱۰ درصد بافت کبد در حضور KCl ۱/۱۵ درصد تهیه شد. سپس درون لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر از این هموژن با ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۱ درصد و ۱ میلی‌لیتر TBA ۰/۶ درصد اضافه گردید. تا این قسمت تمامی مراحل در ظرف محتوی یخ انجام شد. سپس لوله‌ها را درون آب جوش گذاشته و پس از طی مدت ۴۵ دقیقه، ۴ میلی‌لیتر آن - بوتانول به آن‌ها اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید (۱۳).

پس از خنک شدن، لوله‌ها درون دستگاه سانتریفوژ قرار گرفتند و دستگاه در ۴۰۰۰ rpm و زمان ۱۰ دقیقه تنظیم شد. پس از اتمام سانتریفوژ، محلول رویی جدا شده و جذب آن در طول موج ۵۳۲

1-Scoring
2-Mendler

یافته‌ها

نتایج مطالعه نشان داد در گروه کنترل منفی (گروهی که تحت تأثیر استرس بی‌حرکتی قرار گرفته بودند)، تغییرات واضحی در میزان اکسیداسیون لیپیدها، شاخص‌های استرس اکسیداتیو، آنزیم‌های کبدی، شاخص‌های التهابی و تغییر لیپید پروفایل به نفع القای کبد چرب غیرالکی ایجاد شده بود به گونه‌ای که وزن کبد در گروه مبتلا به کبد چرب غیرالکی به صورت معنی‌داری افزایش یافته و مصرف تیمول توانست وزن کبد را کاهش دهد (جدول ۱). همچنین مقدار مالونیل دی‌آلدئید (شاخص اکسیداسیون لیپیدها) در گروه کبد چرب غیرالکی کاهش یافته و پس از درمان با تیمول، به سطح آن در گروه کنترل نزدیک شده است (جدول ۱). مقدار آنزیم‌های گلو‌تاتیون پرکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نیز در گروه کبد چرب غیرالکی کاهش یافته و پس از درمان با تیمول به سطح گروه کنترل نزدیک شده است (جدول ۱). ولی مقدار آنزیم کاتالاز تحت تأثیر القای کبد چرب غیرالکی تغییر معنی‌داری پیدا نکرده بود. مقدار آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات ترانس آمیناز به دنبال القای کبد چرب غیرالکی افزایش چشمگیری یافته و پس از درمان با تیمول به مقدار قابل توجهی کاهش یافته بودند (جدول ۱). مقدار شاخص التهابی فاکتور نکروز بافتی آلفا در گروه مبتلا افزایش یافته و تحت تأثیر درمان با تیمول، کاهش معنی‌داری یافته بود، ولی میزان اینترلوکین ۶ تغییر معنی‌داری پیدا نکرده بود (جدول ۱). تغییر در پروفایل لیپیدی نیز

شامل: افزایش در میزان لیپوپروتئین کم چگال، تری گلیسرید و کلسترول تام و همچنین کاهش در میزان لیپوپروتئین پرچگال در گروه مورد دیده شد که با مصرف تیمول، میزان این متغیرها به حد گروه کنترل برگشته بود (جدول ۱).

تغییرات بافتی ایجاد شده در گروه مورد و بهبود این تغییرات در گروه تحت درمان با تیمول نیز در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است، فیروز پورتال کبدی با گرید یک در ۷۵ درصد موارد و گرید دو در ۵۰ درصد گروه مبتلا ایجاد شده است که این تغییرات در گروه تحت درمان کاهش معنی‌داری یافته است.

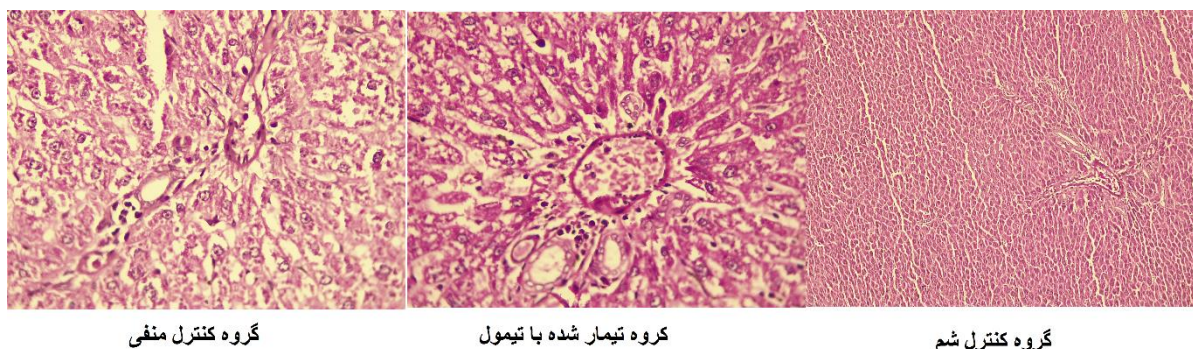
نمودار ۲ نشان می‌دهد که التهاب لوبولی گرید یک و دو به ترتیب در ۶۲/۵ و ۵۰ درصد موارد گروه مبتلا دیده می‌شود در حالی که درمان با تیمول این التهاب را به شدت کاهش داده است.

میزان نکروز بافتی در نمودار ۳ نشان داده شده است که نکروز بافتی با گرید یک در ۱۲/۵ درصد موارد گروه مورد ایجاد شده و با درمان تیمول، به طور کامل درمان شده است و نکروز بافتی گرید دو در ۲۵ درصد موارد در گروه مورد بوده که درمان با تیمول آن را به میزان قابل توجهی کاهش داده است.

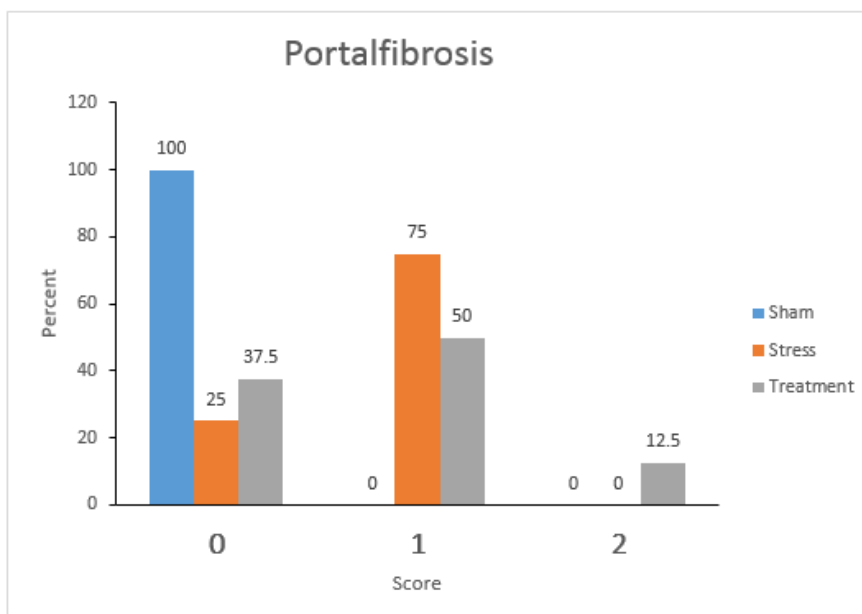
همان‌گونه که در نمودار ۴ نشان داده شده است، تجمع چربی با گرید دو و سه در ۳۷/۵ و ۵۰ درصد موارد گروه مبتلا دیده شد که درمان با تیمول، این تجمع چربی را به طور معنی‌داری کاهش داده است.

جدول ۱: اثر محافظتی تیمول بر پارامترهای مختلف سرم در موش صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه

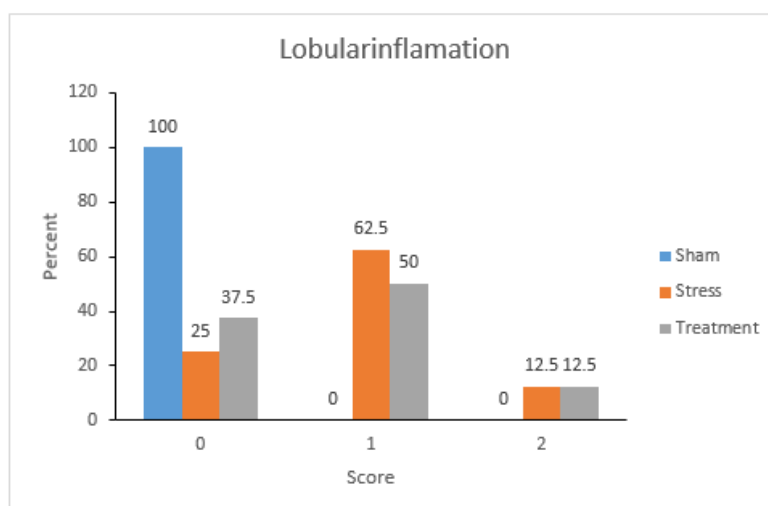
متغیر	گروه			معنی داری
	کنترل شم	کنترل منفی	تحت درمان	
وزن کبد (گرم)	۱±۹	۱±۱۳	۱±۱۱	p<۰/۰۵
مالونیل دآلدئید (نانومول/گرم بافت)	۷۴ ± ۱۷	۵۳ ± ۷	۵۹ ± ۷	p<۰/۰۵
گلوتاتیون پراکسیداز (واحد/لیتر)	۷۵ ± ۱۱	۵۵ ± ۹	۶۱ ± ۱۰	p<۰/۰۱
کاتالاز (واحد/لیتر)	۰/۷ ± ۰/۱	۰/۸ ± ۰/۱	۰/۹ ± ۰/۱	NS
سوپراکسید دیسموتاز (واحد/لیتر)	۸/۳ ± ۰/۲۴	۷/۵ ± ۰/۲	۸/۳ ± ۰/۲	p<۰/۰۵
آلانین آمینو ترانسفراز (واحد/لیتر)	۶۸/۶ ± ۷/۲	۱۰۹/۹ ± ۲۰	۸۳ ± ۸	p<۰/۰۱
آسپارات ترانس آمیناز (واحد/لیتر)	۱۴۹/۳ ± ۱۹/۷	۲۶۳/۲ ± ۴۶	۱۷۱/۵ ± ۲۶/۵	p<۰/۰۱
اینترلوکین ۶ (گرم/میلی لیتر)	۶/۱ ± ۰/۹	۵ ± ۰/۴	۴/۵ ± ۰/۲	NS
فاکتور نکروز بافتی آلفا (گرم/میلی لیتر)	۹۲/۵ ± ۵/۹	۱۱۸/۵ ± ۴/۸	۱۰۲/۵ ± ۷	p<۰/۰۱
ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (میلی مول/لیتر)	۱۳/۳ ± ۱/۹	۱۰/۲ ± ۱/۵	۱۲/۸ ± ۱/۹	p<۰/۰۱
لیپوپروتئین کم چگال (میلیگرم / دسی لیتر)	۲۳/۲ ± ۵	۴۲/۸ ± ۱۲/۳	۲۹/۶ ± ۶/۳	p<۰/۰۱
تری گلیسرید (میلیگرم / دسی لیتر)	۵۸/۶ ± ۸/۳	۷۷/۹ ± ۱۳/۷	۶۴ ± ۱۷/۳	p<۰/۰۵
کلسترول تام (میلیگرم / دسی لیتر)	۷۸ ± ۶/۲	۹۳ ± ۱۱/۵	۸۴ ± ۸/۶	p<۰/۰۱
لیپوپروتئین پر چگال (میلیگرم / دسی لیتر)	۴۳/۱ ± ۳/۶	۳۵/۴ ± ۴	۴۱/۸ ± ۴/۹	p<۰/۰۵



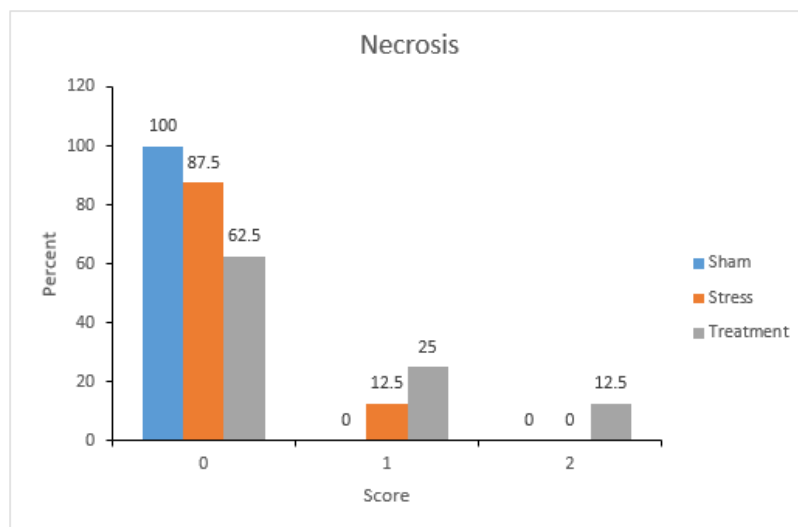
شکل ۱: نمونه بافت رنگ آمیزی شده (هماتوکسیلین اتوزین) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه که نشان دهنده تغییرات بافتی در گروه کنترل منفی و بهبود این تغییرات پس از درمان با تیمول می‌باشد (بزرگنمایی ۴۰ برابر)



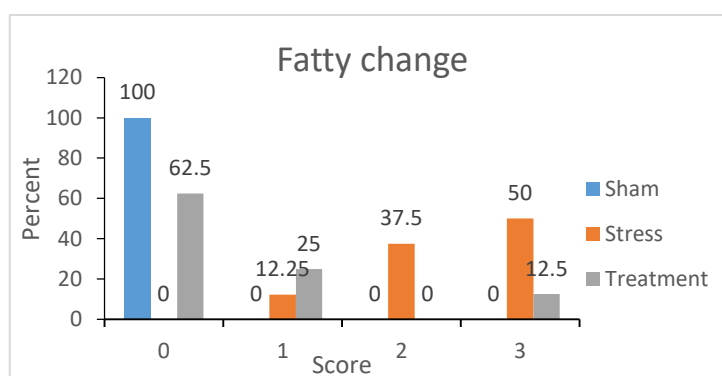
نمودار ۱: مقایسه فیبروز پورتال بافت کبد در گروه‌های مختلف مورد مطالعه



نمودار ۲: مقایسه التهاب لوبولار بافت کبد در گروه‌های مختلف مورد مطالعه



نمودار ۳: مقایسه نکروز بافت کبد در گروه‌های مختلف مورد مطالعه



نمودار ۴: مقایسه تغییرات چربی بافت کبد در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

بحث

می‌گیرد که باعث افزایش نکروز و آسیب به بافت کبد می‌شود. عواملی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان باشند می‌توانند از مرگ سلول‌های کبد جلوگیری کنند. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که تیمول در غلظت ۷۵ میلی‌گرم برکیلوگرم می‌تواند میزان نکروز بافت کبد ناشی از سمیت ایندومتاسین (داروی ضد التهاب غیر استروئیدی) را کاهش دهد (۱۵).

کبد چرب یک فاکتور مهم برای بسیاری از بیماری‌های قلبی - عروقی است که تعداد زیادی از افراد را درگیر می‌کند (۱). در این مطالعه سعی شده است همانند پژوهش‌های مشابه صورت گرفته، از تیمول که در گیاهانی مانند آویشن وجود دارد، به عنوان ماده دارای اثر حفاظتی بر سمیت کبدی حاصل از کبد چرب غیر الکلی استفاده شود. مشخص شده است با حضور عوامل اکسیدان مانند چربی زیاد در کبد، تغییرات خاصی در سلول‌های کبد صورت

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که فیبروز پورتال بافت کبد، در گروه شم کنترل ۱۰۰ درصد بدون آسیب بود، در گروه کنترل منفی (استرس) ۲۵ درصد بدون آسیب و ۷۰ درصد به صورت نکروز تک سلولی جدا و در گروه درمان ۳۷/۵ درصد بدون آسیب، ۵۰ درصد به صورت نکروز تک سلولی و ۱۲/۵ درصد به صورت نکروز بروز کرد. دیگر بررسی‌های پاتولوژیک به این صورت بود که التهاب لوبولار بافت کبد، در گروه شم کنترل ۱۰۰ درصد بدون آسیب بود، در گروه کنترل منفی (استرس) ۲۵ درصد بدون آسیب، ۶۲/۵ درصد به صورت نکروز تک سلولی جدا و ۱۲/۵ درصد به صورت نکروز و در گروه درمان ۳۷/۵ درصد بدون آسیب، ۵۰ درصد به صورت نکروز تک سلولی و ۱۲/۵ درصد به صورت نکروز بروز کرد. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که نکروز بافت کبد، در گروه شم کنترل ۱۰۰ درصد بدون آسیب بود، در گروه کنترل منفی (استرس) ۸۷/۵ درصد بدون آسیب و ۱۲/۵ درصد به صورت نکروز تک سلولی جدا و در گروه درمان ۶۲/۵ درصد بدون آسیب، ۱۲/۵ درصد به صورت نکروز تک سلولی و ۱۲/۵ درصد به صورت نکروز بروز کرد. از سوی دیگر که اجسام مالوری بافت کبد، هیاتوسیت بولونین بافت کبد و فیبروز پیش سینوزوئیدی بافت کبد در هر سه گروه شم کنترل، کنترل منفی و درمان، ۱۰۰ درصد بدون آسیب بود. همچنین کبد چرب باعث افزایش وزن کبد

شد (۰/۰۵ < p) که در گروه کنترل شده با تیمول این میزان کاهش پیدا کرد (۰/۰۱ < p).

استرس اکسیداتیو و به دنبال آن رادیکال‌های آزاد تولید شده در سلول‌ها، باعث پراکسیداسیون چربی‌های غشای سلولی شده و مقدار مالون دی آلدئید افزایش پیدا می‌کند. در این صورت می‌توان از تست بررسی میزان MDA، به عنوان تست اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها و همچنین میزان استرس اکسیداتیو وارد شده استفاده نمود (۱۵). در پژوهش‌های مختلفی مشاهده شده است که در نتیجه کبد چرب میزان MDA و میزان پراکسید چربی‌ها افزایش می‌یابد (۱۸ و ۱۷). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که با تجویز دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمول، مقدار MDA ناشی از سمیت کربن تتراکلراید در بافت کبد موش به صورت معنی‌داری کاهش یافت که می‌تواند اثر محافظتی تیمول را در جلوگیری از استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون چربی‌های به وجود آمده به وسیله تجویز کربن تتراکلراید به عنوان ترکیب اکسیدان و تولید کننده رادیکال‌های آزاد، نشان دهد (۱۹). همچنین مطالعه دیگری نیز اثرات آنتی‌اکسیدانی تیمول در برابر کاهش MDA در بافت کبد موش را نشان داده است (۲۰). در مطالعه حاضر مشخص شد که در حضور کبد چرب، میزان MDA محاسبه شده افزایش داشته است (۰/۰۵ < p). این در حالی است که با پیش درمانی و تجویز تیمول در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، این میزان کاهش می‌یابد (۰/۰۵ < p) که این خود نشان دهنده اثر محافظتی

کرده است ($p < 0.05$). در مورد آنزیم SOD و CAT تفاوت معنی داری بین گروه‌ها مشاهده نشد.

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در کبد چرب غیرالکی میزان آنزیم آلانین ترانسفراز و آسپارات ترانسفراز در نمونه سرم به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۲۲ و ۲۱). از جمله مطالعه آلام و همکاران نشان داد که تیمول در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست میزان ALT را به طور معنی داری در برابر آسیب کبدی ناشی از کربن تتراکلراید در موش را کاهش دهد (۲۰). همچنین در مطالعه دیگری که به وسیله ورما و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که تیمول در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی توانست ALT، AST را کاهش دهد (۲۲). همچنین در مطالعه دیگری بیان شده است که تیمول در غلظت ۱۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی در طول ۴ هفته توانست میزان آنزیم ALT و AST افزایش یافته در نتیجه رژیم غذایی پرچرب در رت را به طور معنی داری کاهش دهد (۲۰). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که میزان ALT و AST در گروه دریافت کننده تیمول به طور معنی داری نسبت به گروه کبد چرب کاهش پیدا کرده است ($p < 0.001$).

پژوهش‌های مختلف نشان داده است که فاکتورهای التهابی نظیر: IL-6، IL-1 β و TNF- α در هنگام بروز کبد چرب غیرالکی زیاد می‌شود (۲۳ و ۱۳). این در حالی است که در پژوهش‌های مختلف نشان داده شده است که تیمول می‌تواند میزان فاکتورهای التهابی

تیمول به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان می‌باشد. می‌توان این طور نتیجه گرفت که تیمول همانند سایر مواد آنتی‌اکسیدان، با جلوگیری از استرس اکسیداتیو و مهار پراکسیداسیون چربی‌های غشا، باعث افزایش بقای سلولی می‌شود.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در حفاظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارد. یکی از مکانیسم‌های عمده تخریب بافتی ناشی از رادیکال‌های آزاد پراکسیداسیون لیپیدهاست. این آنزیم‌ها نقش اساسی در مهار این فرآیند ایفا می‌کند (۱۵). نشان داده شده است که کبد چرب در بدن باعث آسیب‌های اکسیداتیو شده که خود باعث کاهش این آنزیم‌ها می‌گردد (۱۶). همچنین نشان داده شده است که سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند تیمول با جذب رادیکال‌های آزاد نقش بسیار مهمی در تعدیل فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز و SOD در کارایی اسپرم در رت دارد (۱۷). در مطالعه دیگری ثابت شده است که تجویز دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمول به مدت ۱۲ روز در موش صحرایی توانسته میزان SOD، GPx و CAT موجود در بافت کلیه را افزایش داده و به دنبال آن نفروتوکسیستی القا شده به وسیله جنتامایسین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را کاهش دهد (۱۸). در مطالعه حاضر نشان داده شده است که در نتیجه کبد چرب میزان GPx اندازه‌گیری شده نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا می‌کند ($p < 0.01$) و این در حالی است که با تجویز تیمول به عنوان یکی از عوامل آنتی‌اکسیدان، میزان این آنزیم افزایش پیدا

در برابر عوامل مختلف را کاهش دهد. از جمله در مطالعه تانسر و همکاران صورت گرفت نشان داد که مونوترین تیمول می تواند سیتوکاین های التهابی شامل؛ IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 افزایش یافته به وسیله الاستاز در موش را کاهش دهد (۲۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گروه کبد چرب میزان TNF- α به میزان معنی داری افزایش یافته است ($p < 0/05$) و گروه تیمار شده با تیمول توانسته است این میزان را به صورت معنی داری کاهش دهد ($p < 0/05$). در مورد سیتوکاین IL-6 بین گروه ها تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

هنگام بروز کبد چرب میزان فاکتورهای چربی شامل LDL و کلسترول افزایش می یابد. در پژوهش های مختلف نشان داده شده است که تیمول می تواند میزان چربی های مضر در بدن را کاهش دهد. در مطالعه ای که در مورد اثرات حفاظتی تیمول در برابر آسیب های ناشی از دیابت نوع ۲ صورت گرفت نشان داد که این مونوترین می تواند میزان LDL، کلسترول تام و تری گلیسرید را کاهش داده و میزان HDL را افزایش دهد. در این مطالعه تیمول به مدت ۱۰ هفته به صورت داخل صفاقی در غلظت های ۱۰ تا ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش تزریق شده بود. نتایج کلی این مطالعه نشان داد که تیمول با توانایی کاهش فاکتورهای چربی می تواند درمانی برای دیابت نوع ۲ باشد (۲۵). همچنین در مطالعه ای دیگر که اثر حفاظتی تیمول در برابر سمیت ناشی از STZ^(۱) در رت صورت گرفت نشان داد که تجویز خوراکی تیمول در دوز ۴۰

میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۸ روز توانست میزان LDL و کلسترول تام را کاهش دهد. در حالی که میزان HDL را افزایش داد (۲۶).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که میزان تری گلیسرید در گروه کبد چرب به صورت معنی داری افزایش یافته است ($p < 0/01$). در حالی که در گروه تیمار شده با تیمول این میزان به حداقل رسیده است ($p < 0/01$). همچنین میزان کلسترول تام در گروه کبد چرب به صورت معنی داری افزایش یافت ($p < 0/05$). در حالی که در گروه تیمار شده با تیمول این میزان کاهش یافت ($p < 0/01$). در مورد میزان LDL هم در گروه کبد چرب افزایش ($p < 0/01$) و در گروه تیمار شده با تیمول این میزان به صورت معنی داری کاهش پیدا کرد ($p < 0/01$). همچنین میزان HDL در گروه کبد چرب به صورت معنی داری کاهش یافت ($p < 0/01$) و در گروه تیمار شده با تیمول این میزان افزایش پیدا کرد ($p < 0/01$).

در این مطالعه به دلیل محدودیت منابع مالی بعضی از شاخص های استرس اکسیداتیو، التهابی و کبدی اندازه گیری نشد که ممکن بود در تفسیر نتایج می توانست مفید و مؤثر باشد.

انجام مطالعه بر روی هر دو جنس موش صحرایی و اندازه گیری عمده شاخص های استرس اکسیداتیو، شاخص های التهابی مؤثر در کبد چرب

1-Streptozotocin

خود را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه
اعلام می‌دارند.

غیرالکی و اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی برای تفسیر
بهتر نتایج انجام مطالعه بر روی کبد چرب غیرالکی
ایجاد شده به روش شیمیایی و مقایسه با نتایج
مطالعه حاضر انجام پذیرد.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های صورت گرفته در پژوهش حاضر
و همچنین پژوهش‌های منطبق با اهداف پژوهش ما
نشان داد که تیمول در کاهش فاکتورهای التهابی از
جمله $\text{TNF-}\alpha$ ، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی
مثل GPx و کاهش پروفایل چربی مثل LDL،
تری‌گلیسرید و کلسترول تام و همچنین کاهش
لیپیدپراکسیداسیون می‌تواند آسیب ناشی از کبد چرب
غیرالکی را کاهش دهد، لذا می‌توان این فرضیه را
پذیرفت که تیمول می‌تواند به عنوان درمان در بهبود
عملکرد کبد چرب غیرالکی ناشی از استرس بی
حرکتی مزمن مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی
ارشد رشته فیزیولوژی با کد اخلاق
IR.ZAUMS.REC.1397.416 دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
می‌باشد که با حمایت مالی و معنوی این دانشگاه
انجام شد. لذا نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر

REFERENCES

1. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases* 2010; 28(1): 155-61.
2. Atrashi M, Tavokoli Dinanie E, Darzi MT, Hashemi J, Rozbeh S, Masumi A. Effect of ultrasound on the production of Carvone as a secondary metabolite in callus derived from *Bunium persicum* Boiss. *Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs)* 2011; 2(2): 129-35.
3. Shahbazi A, Ghorbani R, Frivar F, Shah-Hoseini A. A survey on the starting age of complementary feeding and some of its associated factors in the breast-feeding infants (Semnan, Iran). *Koomesh* 2007; 20: 59-66.
4. Mohsenpour M, Vafadar M, Vatankhah E, Meighani H. The impact of the environmental factors on yield and chemical compositions of essential oil of water mint, *Mentha aquatica* L. from different habitats of Mazandaran province. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)* 2017; 30(2): 440-51.
5. Hamaguchi M, Kojima T, Ohbora A, Takeda N, Fukui M, Kato T. Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2012; 18(3): 237.
6. Yang KC, Hung HF, Lu CW, Chang HH, Lee LT, Huang KC. Association of non-alcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome independently of central obesity and insulin resistance. *Scientific Reports* 2016; 6: 27034.
7. Kuo KL, Weng MS, Chiang CT, Tsai YJ, Lin-Shiau SY, Lin JK. Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(2): 480-9.
8. Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, Kobayashi M, Unno T, Tomoyori H, et al. Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *The Journal of Nutrition* 2005; 135(2): 155-9.
9. Gerdes S, Lerma-Ortiz C, Frelin O, Seaver SM, Henry CS, de Crécy-Lagard V, et al. Plant B vitamin pathways and their compartmentation: a guide for the perplexed. *Journal of Experimental Botany* 2012; 63(15): 5379-95.
10. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49(9): 4168-70.
11. Geyikoglu F, Yilmaz EG, Erol HS, Koc K, Cerig S, Ozek NS, et al. Hepatoprotective role of thymol in drug-induced gastric ulcer model. *Annals of Hepatology* 2019; 17(6): 980-91.
12. Toshimitsu K, Matsuura B, Ohkubo I, Niiya T, Furukawa S, Hiasa Y, et al. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition* 2007; 23(1): 46-52.
13. Lari P, Abnous K, Imenshahidi M, Rashedinia M, Razavi M, Hosseinzadeh H. Evaluation of diazinon-induced hepatotoxicity and protective effects of crocin. *Toxicology and Industrial Health* 2015; 31(4): 367-76.
14. Sandalio LM, Fernández VM, Rupérez FL, Del Río LA. Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiology* 1988; 87(1): 1-4.
15. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta* 2007; 380(1-2): 50-8.
16. Al-Malki AL. Antioxidant properties of thymol and butylated hydroxytoluene in carbon tetrachloride-induced mice liver injury. *Journal of King Abdulaziz University: Science* 2010; 148(632): 1-21.
17. Alam K, Nagi M, Badary O, Al-Shabanah O, Al-Rikabi A, Al-Bekairi A. The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Pharmacological Research* 1999; 40(2): 159-63.
18. Ahmed I, John A, Vijayasathya C, Robin M, Raza H. Differential modulation of growth and glutathione metabolism in cultured rat astrocytes by 4-hydroxynonenal and green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Neurotoxicology* 2002; 23(3): 289-300.
19. Yousefi M, Hoseini SM, Vatnikov YA, Nikishov AA, Kulikov EV. Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. *Aquaculture* 2018; 495: 376-83.
20. Güvenç M, Cellat M, Gökçek İ, Yavaş İ, Yurdağül Özsoy Ş. Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2019; 125(5): 396-403.
21. Ali SM, Khalifa HA, Yousef A. Protective effect of thymol and carvacrol on gentamycin-induced oxidative stress in male Albino rat. *Benha Veterinary Medical Journal* 2019; 37(1): 204-9.

22. Tuncer I, Uygan I, Dülger H, Türkdoğan K, Şekeroğlu R, Kösem M. The comparative effects of pentoxifylline and ursodeoxycholic acid on IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α levels in nonalcoholic fatty liver. *Eastern Journal of Medicine* 2003; 8(2): 27-32.
23. Games E, Guerreiro M, Santana FR, Pinheiro NM, De Oliveira EA, Lopes FD, et al. Structurally related monoterpenes p-Cymene, carvacrol and thymol isolated from essential oil from leaves of *Lippia sidoides* cham.(Verbenaceae) protect mice against elastase-induced emphysema. *Molecules* 2016; 21(10): 1390.
24. Agarwal S, Tripathi R, Mohammed A, Rizvi SI, Mishra N. Effects of thymol supplementation against type 2 diabetes in streptozotocin-induced rat model. *Plant Archives* 2020; 20(1): 863-9.
25. Haque MR, Ansari SH, Najmi AK, Ahmad MA. Monoterpene phenolic compound thymol prevents high fat diet induced obesity in murine model. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2014; 24(2): 116-23.
26. Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver International* 2013; 33(9): 1398-1405.

Evaluation of the Effects of Thymol on Non-Alcoholic Fatty Liver Caused by Chronic Immobility Stress in Rats

Miri S¹, Komeili GH^{1*}, Niazi AA², Shahraki MR¹

¹Department of Physiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran, ²Departments of Pathology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Received: 11 July 2021 Accepted: 08 Dec 2021

Abstract:

Background & aim: Thymol is a phenolic monoterpene that has been reported its antioxidant and anti-inflammatory properties in previous studies and appears to have a protective role for the liver against damage caused by free radicals. Therefore, the aim of the present study was to determine the effects of Thymol on non-alcoholic fatty liver caused by chronic immobility stress in rats.

Methods: The present experimental study was conducted in 2020. 24 Wistar rats were included in the study and divided into 3 equal groups; Control sham, negative control and treatment (Thymol recipient at a dose of 100 mg/kg). After 60 days, the mice were anesthetized with ketamine and xylazine and blood samples were taken from the heart and the whole liver was removed for histological examination. Inflammatory factors including IL-6 and TNF- α , antioxidant enzymes including; GPx, SOD and catalase, fat profiles including LDL, HDL, triglyceride and total cholesterol as well as malondialdehyde (MDA) were examined. The collected data were analyzed using one-way analysis of variance and Turkey's post hoc test.

Results: The results indicated that in the fatty liver group, the amount of antioxidant enzymes decreased and fat factors and the amount of MDA increased. While treatment with Thymol was able to bring these factors closer to normal. Pathological results exposed that Thymol can reduce the amount of damage caused to non-alcoholic fatty liver by reducing cell necrosis.

Conclusion: The present study revealed that Thymol with antioxidant properties can improve non-alcoholic fatty liver function due to chronic immobility stress by reducing inflammatory markers, increasing antioxidant indices and reducing cell necrosis.

Keywords: Thymol, Nonalcoholic fatty liver, Chronic restraint stress.

Corresponding Author: Komeili GH, Department of Physiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
Email: rkomeili@gmail.com

Please cite this article as follows: Miri S, Komeili GH, Niazi AA, Shahraki MR. Evaluation of the Effects of Thymol on Non-Alcoholic Fatty Liver Caused by Chronic Immobility Stress in Rats. *Armaghane-danesh* 2022; 26(6): 884-898.