

The effect of a swimming exercise program combined with a nutritional supplement on the expression of BIP, CHOP, Cox18, Oxa1 genes and Col3A1 concentration in aged rats with fatty liver disease

Fatemeh Afshari¹ - Fariba Aghaei^{2*} - Alireza Rahimi³ - Foad Feizolahi⁴
1,2,3,4. Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran

(Received:2025/09/15; Accepted:2026/02/06)

Abstract

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is one of the major public health challenges, with its prevalence increasing with age. Physiological changes associated with aging, such as reduced liver function, elevated oxidative stress, and impaired lipid metabolism, contribute to the development of this disorder. Evidence suggests that regular physical activity and the use of antioxidant supplements can play a significant role in the prevention and management of MASLD. The present study aimed to investigate the effect of an eight-week moderate-intensity swimming program combined with silymarin and vitamin C supplementation on the expression of genes related to cellular stress (BIP and CHOP), mitochondrial function (Cox18 and Oxa1), and tissue fibrosis marker (Col3A1) in aged male Wistar rats with MASLD. Twenty-five rats (14–16 months old) were randomly divided into five groups: healthy control, diseased control, swimming, supplement, and swimming + supplement. The swimming protocol was performed five sessions per week for eight weeks (30–60 minutes per session, 60–70% of maximal capacity), while the combined supplement (100 mg/kg silymarin and 500 mg/kg vitamin C) was administered daily by gavage. Gene expression was assessed using real-time PCR, and Col3A1 concentration was measured by ELISA. Results showed that swimming combined with supplementation significantly reduced BIP and CHOP expression, increased Cox18 and Oxa1 expression, and decreased Col3A1 levels compared to the diseased group. Therefore, the combined intervention of regular exercise and antioxidant supplementation may serve as an effective non-pharmacological strategy to reduce cellular stress, improve mitochondrial function, and prevent hepatic fibrosis during aging.

Keywords:

Aged Male Wistar Rats, Gene Expression, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), Silymarin, Swimming Exercise.

بررسی نقش یک دوره تمرین شنا به همراه مصرف مکمل ترکیبی در رت‌های پیر مبتلا به کبد چرب بر میزان بیان ژن‌های Oxa1، Cox 18، CHOP، BIP و غلظت Col3A1

فاطمه افشاری^۱ - فریبا آقائی^{۲*} - علی‌رضا رحیمی^۳ - فواد فیض‌الهی^۴
۱، ۲، ۳، ۴. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۲۵، تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۱۱/۱۷)

چکیده

بیماری کبد چرب غیرالکلی یکی از چالش‌های مهم سلامت عمومی است که شیوع آن با افزایش سن بیشتر می‌شود. تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از پیری مانند کاهش عملکرد کبد، افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال در متابولیسم چربی، زمینه‌ساز بروز این بیماری هستند. شواهد نشان می‌دهد که فعالیت بدنی منظم و مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند در پیشگیری و کنترل کبد چرب غیرالکلی مؤثر باشند. هدف این پژوهش، بررسی اثر یک دوره تمرین شنا با شدت متوسط همراه با مصرف مکمل ترکیبی سیلیمارین و ویتامین C بر بیان ژن‌های مرتبط با استرس سلولی BIP و CHOP، عملکرد میتوکندری Cox18 و Oxa1 و شاخص فیبروز بافتی (Col3A1) در موش‌های نر ویستار پیر مبتلا به MASLD بود. در این مطالعه تجربی، ۲۵ موش ۱۴ تا ۱۶ ماهه به پنج گروه (کنترل سالم، کنترل بیمار، تمرین شنا، مکمل، و تمرین شنا+مکمل) تقسیم شدند. تمرین شنا به مدت ۸ هفته، ۵ جلسه در هفته (۳۰ تا ۶۰ دقیقه، ۶۰-۷۰٪ ظرفیت بیشینه) و گاوژ روزانه مکمل (سیلیمارین ۱۰۰ و ویتامین C ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) انجام شد. بیان ژن‌ها با روش Real-Time PCR و غلظت Col3A1 با آزمون ELISA اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد تمرین شنا همراه با مکمل موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های BIP و CHOP، افزایش بیان Cox18 و Oxa1 و کاهش سطح Col3A1 نسبت به گروه بیمار شد. بنابراین، مداخله ترکیبی تمرین و مکمل آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌عنوان راهکاری غیردارویی مؤثر برای کاهش استرس سلولی، بهبود عملکرد میتوکندری و پیشگیری از فیبروز کبدی در دوران پیری مطرح شود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن، تمرین شنا، سیلیمارین، کبد چرب غیرالکلی، موش‌های نر ویستار پیر.

مقدمه

پیری فرآیندی فیزیولوژیکی پیچیده است که با کاهش تدریجی عملکردهای بیولوژیکی و برهم خوردن تعادل هموستاتیک مشخص می‌شود (۱). در این دوران، عملکرد اندام‌های حیاتی از جمله کبد دچار افت قابل توجه می‌گردد و این امر با کاهش جریان خون کبدی، تضعیف توانایی سم‌زدایی و افزایش تجمع رادیکال‌های آزاد همراه است که به بروز استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی منجر می‌شود (۲). همچنین با افزایش سن، تغییرات نامطلوبی در متابولیسم چربی و توزیع لیپیدها در بافت‌های غیرچربی مانند کبد مشاهده شده است (۳). از سوی دیگر، افزایش سن معمولاً با کاهش ظرفیت عملکرد میتوکندری، ضعف پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش حساسیت سلول‌های کبدی نسبت به التهاب و آپوپتوز همراه می‌شود؛ عواملی که می‌توانند زمینه پیشرفت آسیب‌های متابولیک کبدی را تشدید کنند. در همین راستا، شواهد تجربی نشان داده‌اند که اختلال در متابولیسم چربی، استرس اکسیداتیو و فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی از مهم‌ترین سازوکارهای درگیر در پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی هستند (۴).

بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک (MASLD) یکی از پیامدهای مهم این تغییرات محسوب می‌شود که با تجمع بیش از ۵٪ چربی در هپاتوسیت‌ها مشخص می‌گردد. این بیماری از یک استئاتوز ساده تا فیروز و در نهایت سیروز و کارسینوم سلول‌های کبدی پیشرفت می‌کند (۵). در سال‌های اخیر، بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک،

به‌عنوان یکی از شایع‌ترین علل مزمن کبدی در جهان شناخته شده و به یکی از چالش‌های درمانی مهم سلامت عمومی تبدیل شده است (۶). این بیماری یک طیف پیشرونده دارد که از تجمع ساده چربی در کبد آغاز شده و در صورت تداوم اختلالات متابولیک، می‌تواند با التهاب، استرس اکسیداتیو، فیروز و آسیب‌های پیشرفته‌تر کبدی همراه شود (۷). همچنین، شواهد نشان می‌دهد که تجمع اسیدهای چرب و تری‌گلیسیریدها در کبد، در نتیجه افزایش دریافت چربی و کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب، می‌تواند به اختلال در متابولیسم لیپید و تشدید کبد چرب غیرالکلی منجر شود (۸). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مداخلات سبک زندگی شامل فعالیت بدنی منظم و اصلاح رژیم غذایی می‌تواند در پیشگیری و درمان MASLD مؤثر باشد (۹). به‌ویژه تمرین‌های هوازی با شدت متوسط تا زیاد سبب بهبود حساسیت به انسولین، کاهش تری‌گلیسیرید و کاهش التهاب کبدی گزارش شده‌اند (۱۰). برای نمونه، در یک مطالعه، هشت هفته تمرین هوازی موجب کاهش معنی‌دار در سطوح آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در مبتلایان به MASLD شد (۱۱). با این حال، نتایج برخی تحقیقات متناقض بوده و هنوز درباره نوع، شدت و مدت تمرین درمانی بهینه، اجماع علمی وجود ندارد (۱۲).

در همین زمینه، نتایج پژوهش‌های حیوانی نشان داده است که تمرین ورزشی می‌تواند از طریق کاهش تجمع چربی در کبد، افزایش اکسیداسیون اسیدهای

گزارش شده است که هشت هفته تمرین تناوبی شنا با شدت بالا می‌تواند موجب کنترل افزایش وزن ناشی از رژیم پرچرب و کاهش برخی آنزیم‌های کبدی مانند ALT، AST و GGT در موش‌های مبتلا به NASH شود و همچنین بر بیان PPAR- α کبدی اثر بگذارد (۱۴). در پژوهشی دیگر، تمرین تناوبی شنا با شدت بالا در موش‌های مبتلا به NASH موجب کاهش التهاب سیستمیک، به‌ویژه hs-CRP، و کاهش قند خون ناشتا شد و احتمالاً از طریق کنترل RBP4 کبدی و مقاومت به انسولین می‌تواند در کند کردن روند پیشرفت بیماری نقش داشته باشد (۱۵). همچنین نشان داده شده است که این نوع تمرین می‌تواند با افزایش آدیپونکتین و کاهش آسپرووسین، دو شاخص مهم مرتبط با التهاب، مقاومت به انسولین و متابولیسم کبدی را در مدل NASH بهبود دهد (۱۶). از سوی دیگر، توجه به درمان‌های مکمل و گیاهی به‌عنوان رویکردی غیردارویی در کنترل MASLD افزایش یافته است. ترکیبات گیاهی آنتی‌اکسیدان مانند سیلیمارین استخراج‌شده از گیاه خارمریم و ویتامین C به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود، در محافظت از سلول‌های کبدی مؤثر گزارش شده‌اند (۱۷-۱۹). این ترکیبات از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، مهار استرس اکسیداتیو و بهبود عملکرد میتوکندری، در مسیرهای سلولی مرتبط با سلامت کبد نقش دارند.

بنابراین انتظار می‌رود که استفاده هم‌زمان از فعالیت بدنی منظم و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی بتواند اثرات درمانی هم‌افزا در کاهش استرس سلولی و بهبود

چرب، بهبود حساسیت انسولینی، کاهش التهاب و تعدیل مسیرهای مولکولی مرتبط با آسیب کبدی، نقش محافظتی در برابر NAFLD داشته باشد (۱۳). همچنین گزارش شده است که تمرین با شدت متوسط در مقایسه با برخی شدت‌های دیگر، اثر بارزتری بر بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آپوپتوز هپاتوسیت‌ها دارد و این اثر احتمالاً از طریق تنظیم مسیرهای استرس شبکه آندوپلاسمی، به‌ویژه مسیرهای IRE1/JNK و eIF2 α /CHOP اعمال می‌شود (۴).

در میان انواع تمرین‌های ورزشی، تمرین شنا به دلیل ماهیت هوازی، کاهش فشار مکانیکی بر اندام‌ها و قابلیت کنترل شدت تمرین، به‌ویژه در مدل‌های حیوانی کبد چرب مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای بر مدل موشی کبد چرب غیرالکلی ناشی از رژیم پرچرب، هشت هفته تمرین شنا توانست آسیب کبدی، استئاتوز، التهاب و فیبروز را کاهش دهد و بخشی از اثر محافظتی آن از طریق مهار افزایش بیان HMGCS2 و تعدیل مسیر Wnt3a/ β -catenin گزارش شد (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، تمرین شنا و روزه‌داری متناوب هر دو توانستند با کاهش miR-122-5p و SREBP-1c و افزایش CPT1A، متابولیسم چربی کبد را بهبود دهند؛ هرچند ترکیب این دو مداخله اثر افزوده معنی‌داری نسبت به هر مداخله به‌تنهایی نشان نداد (۸).

مطالعات فارسی مرتبط با تمرین شنا نیز اهمیت این نوع مداخله را در مدل‌های کبد چرب و استئاتوهپاتیت غیرالکلی تأیید کرده‌اند. برای مثال،

عملکرد کبد داشته باشد. در تأیید این موضوع، پژوهش‌های جدید نشان داده‌اند که سیلیمارین به‌عنوان ترکیب فعال گیاه خارمریم، علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، می‌تواند در کاهش اختلال عملکرد میتوکندری و تعدیل مسیرهای میتوفاژی نقش داشته باشد. در یک مطالعه حیوانی، تمرین ورزشی و مصرف سیلیمارین هر دو توانستند فعال‌سازی بیش‌ازحد سیگنال‌های مرتبط با میتوفاژی را در هپاتوسیت‌های رت‌های مبتلا به NAFLD تعدیل کنند و از آسیب بیشتر کبدی جلوگیری نمایند (۲۰). همچنین مطالعات مربوط به ترکیب تمرین هوازی با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی نشان می‌دهد که این نوع مداخلات می‌توانند از طریق فعال‌سازی مسیرهای دفاع آنتی‌اکسیدانی، از جمله مسیر Keap1/Nrf2/ARE، موجب افزایش بیان ژن‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش تولید ROS، کاهش سیتوکین‌های التهابی و بهبود وضعیت استئاتوز کبدی شوند (۷). اگرچه ترکیب مورد استفاده در برخی مطالعات متفاوت از سیلیمارین بوده است، اما از نظر مکانیسمی نشان می‌دهد که همراهی فعالیت بدنی با یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی می‌تواند رویکردی چندهدفه برای کاهش استرس اکسیداتیو، التهاب و آسیب کبدی در NAFLD/MASLD باشد (۷).

در کنار شاخص‌های آنزیمی مانند AST و ALT، بررسی شاخص‌های مولکولی از جمله بیان ژن‌های BIP (نشانگر استرس شبکه آندوپلاسمی)، CHOP (نشانگر آپوپتوز القا شده توسط استرس)، Cox18 و Oxa1 (درگیر در عملکرد میتوکندری)، و Col3A1

(شاخص فیبروز بافتی) می‌تواند در ارزیابی اثر مداخلات درمانی بر عملکرد کبدی در مدل‌های حیوانی ارزشمند باشد (۲۱-۲۳). اهمیت انتخاب این شاخص‌ها زمانی بیشتر می‌شود که بدانیم استرس شبکه آندوپلاسمی و اختلال عملکرد میتوکندری از مسیرهای کلیدی در پیشرفت NAFLD هستند. در مدل‌های حیوانی، رژیم پرچرب با افزایش شاخص‌های استرس شبکه آندوپلاسمی و مسیرهای آپوپتوزی مانند CHOP، JNK و Caspase-3 همراه بوده و تمرین ورزشی توانسته است بخشی از این تغییرات را تعدیل کند (۴). از سوی دیگر، میتوفاژی و کنترل کیفیت میتوکندری برای حفظ هموستاز کبدی اهمیت دارد و اختلال در این فرایند می‌تواند موجب افزایش استرس اکسیداتیو، التهاب و آسیب سلولی شود؛ بنابراین بررسی ژن‌های مرتبط با عملکرد میتوکندری در کنار شاخص‌های استرس سلولی و فیبروز، برای تبیین اثر تمرین و مکمل آنتی‌اکسیدانی ضروری است (۲۰).

بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی نقش یک دوره تمرین شنا به‌عنوان مداخله درمانی غیردارویی، همراه با مصرف ترکیبی سیلیمارین و ویتامین C، بر بیان ژن‌های مرتبط با استرس سلولی و فیبروز در رت‌های پیر مبتلا به MASLD طراحی و اجرا گردید تا درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی مؤثر بر بهبود عملکرد کبد در دوران پیری فراهم شود. با توجه به اینکه مطالعات اخیر، اثرات تمرین شنا را بر کاهش التهاب، بهبود مقاومت به انسولین، تعدیل متابولیسم چربی، کاهش آسیب میتوکندریایی و

۲. گروه کنترل پیر مبتلا به MASLD :

موش‌هایی که با رژیم پرچرب (۶۰٪ چربی) دچار کبد چرب شدند و درمانی دریافت نکردند.

۳. گروه MASLD + تمرین شنا: موش‌های

مبتلا به MASLD که تحت تمرین شنا قرار گرفتند.

۴. گروه MASLD + مکمل: موش‌های مبتلا که

مکمل ترکیبی دریافت کردند.

۵. گروه MASLD + تمرین شنا + مکمل:

موش‌هایی که هم تمرین شنا انجام دادند و هم مکمل دریافت کردند.

برای اطمینان از همسانی مدل، درجه کبد چرب

در همه حیوانات توسط آزمون بافت‌شناسی (HE)

(staining) پیش از شروع مداخله بررسی شد تا از

یکنواختی شدت بیماری اطمینان حاصل شود (۲۴).

پروتکل تمرین شنا

پروتکل تمرینی بر اساس استانداردهای تمرین

استقامتی در مدل‌های حیوانی تنظیم شد (۲۵، ۲۶).

به منظور جلوگیری از استرس ناگهانی، موش‌ها ابتدا

طی پنج جلسه آشنایی با آب سازگار شدند. سپس

تمرین اصلی به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته

در مخزن پلاستیکی با ابعاد ۴۰×۵۰×۶۰ سانتی‌متر و

دمای آب ۱±۳۱ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

شدت تمرین در هفته‌های ابتدایی متوسط (۶۰٪

ظرفیت بیشینه) و به تدریج تا ۷۰٪ افزایش یافت که

در جدول ۱ آورده شد.

کنترل مسیرهای استرس سلولی نشان داده‌اند (۴)–

(۱۶)، بررسی هم‌زمان بیان ژن‌های BIP ، CHOP ،

Cox18 و Oxa1 و غلظت Col3A1 می‌تواند تصویر

دقیق‌تری از اثرات احتمالی تمرین شنا و مکمل ترکیبی

سیلیمارین و ویتامین C بر محور استرس آندوپلاسمی،

عملکرد میتوکندری و فیبروز کبدی در رت‌های پیر

مبتلا به MASLD ارائه دهد.

روش‌شناسی پژوهش

این پژوهش به صورت تجربی و آزمایشگاهی به

مدت پنج ماه در مرکز تحقیقاتی فن‌آوران بافت و ژن

پاسارگاد انجام شد. کلیه مراحل مطالعه با رعایت اصول

اخلاقی اجرا گردید.

تقسیم‌بندی گروه‌های حیوانی

در این مطالعه، ۲۵ موش نر ویستار پیر (۱۸ تا ۲۰

ماهه) با میانگین وزن ۲۰۰ تا ۳۵۰ گرم از انستیتو

پاستور کرج تهیه شدند. حیوانات پس از یک دوره

سازگاری ۱۴ روزه، در شرایط کنترل‌شده‌ی دمایی (۲۲

تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت ۵۰ تا ۵۵ درصد، و

چرخه‌ی روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند.

آب و غذای استاندارد آزمایشگاهی به صورت آزاد در

اختیار آنها قرار گرفت.

موش‌ها به صورت تصادفی در پنج گروه پنج‌تایی

تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل سالم: موش‌های پیر سالم که رژیم

معمول دریافت کردند.

- هر جلسه شامل سه مرحله بود:
۱. گرم کردن: ۵ دقیقه شنا با شدت کم؛
 ۲. شنا اصلی: ۳۰ تا ۶۰ دقیقه شنا مداوم؛
 ۳. سرد کردن: ۵ دقیقه با شدت کم.
- برای اطمینان از کنترل شدت تمرین، نسبت زمان فعالیت به استراحت و زمان غوطه‌وری با توجه به پروتکل‌های مورد تأیید مطالعات مشابه تنظیم گردید (۲۷).

جدول ۱. ویژگی‌های برنامه تمرینی شنا در رت‌های پیر مبتلا به MASLD

نوع فعالیت	دمای آب (°C)	شدت تخمینی (% ظرفیت بیشینه)	مدت هر جلسه (دقیقه)	دفعات تمرین در هفته	هفته
سازگاری و تمرین سبک	۳۱±۱	۶۰	۳۰-۳۵	۵ جلسه	۱-۲
تمرین استقامتی متوسط	۳۱±۱	۶۵	۴۰-۵۰	۵ جلسه	۳-۵
تمرین استقامتی پایدار	۳۱±۱	۷	۵۰-۶۰	۵ جلسه	۶-۸

مکمل ترکیبی

استخراج RNA تام از نمونه‌های بافت کبد با استفاده از کیت RiboEX (SinaClon, Iran) که مبتنی بر روش فنل-کلروفرم است، انجام گردید. خلوص و غلظت RNA با استفاده از دستگاه NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنتر cDNA از RNA خالص‌شده با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (SinaClon, Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3Plus و OligoAnalyzer طراحی و اعتبارسنجی شدند. ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده گردید.

واکنش Real-Time PCR در دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) انجام شد. شرایط

مکمل شامل ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلیمارین و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C بود (۲۸،۲۹). مکمل‌ها به‌صورت گاوژ روزانه (۱ میلی‌لیتر در هر حیوان) پنج روز در هفته و طی هشت هفته متوالی تجویز شدند. گروه‌های کنترل نیز به‌صورت مشابه نرمال سالیان دریافت کردند تا اثر گاوژ کنترل شود.

برای اطمینان از دقت در تجویز، حیوانات پیش از گاوژ به‌آرامی مهار شده و مکمل با سرنگ تزریق مخصوص حیوانات بر روی زبان ریخته می‌شد تا بلعیده شود.

بررسی میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه

به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های هدف (BIP, CHOP, Cox18 و Oxa1) از روش Real-Time PCR با استفاده از رنگ فلورسانس SYBR Green بهره گرفته شد که در جدول ۲ به آن اشاره گردید.

در سه تکرار تکنیکی انجام شدند. میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش لیواک و اشمیتگن¹ (30) $\Delta\Delta Ct$ 2⁻ محاسبه شد.

چرخه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای 95°C به مدت 10 دقیقه، به دنبال آن 40 چرخه شامل دناتوراسیون در 95°C به مدت 15 ثانیه و اتصال و بسط در 60°C به مدت 60 ثانیه بود. تمامی واکنش‌ها

جدول 2. توالی پرایمرهای ژن‌های Oxa1، Cox18، CHOP، BIP و ژن مرجع GAPDH

پرایمر (5'→3')	پرایمر (5'→3')	ژن (Gene)
Reverse (5'→3')	Forward (5'→3')	
TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	r-GAPDH
ATCTTGGCTGCTTCTCGCTG	AACTGGGGCTTGGCTTAC	r-OXA1
CACCAACAGAGACAGGCAGA	CCACACATTCAGACGGCATT	r-COX18
CTCAAAGGCGAAAGGCAGAGA	GCAGCGACAGAGCCAAAATAAC	r-CHOP
AAGGGTCATTCCAAGTGCGT	TGAAGGGGAGCGTCTGATTG	r-BIP

باعث تغییر رنگ محلول از آبی به زرد گردید که در شکل 1 مشاهده می‌شود.

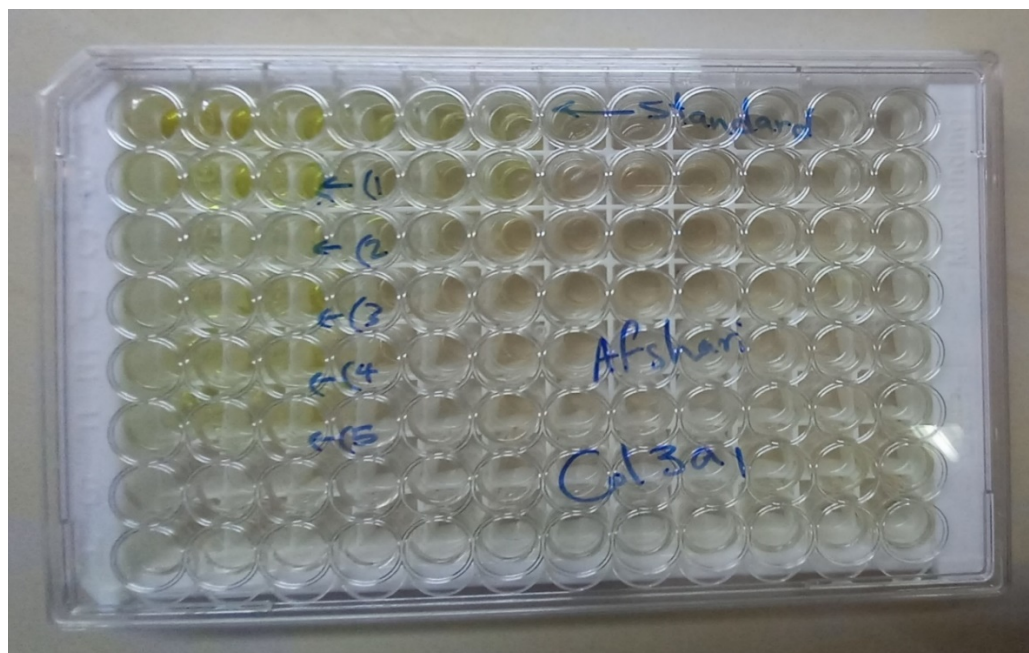
در پایان، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج 450 نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (BioTek, USA) قرائت شد. با استفاده از جذب استاندارد، منحنی استاندارد رسم و غلظت نمونه‌ها از روی معادله خط رگرسیون تعیین گردید (شکل 1).

روش کار آزمون ELISA

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین Col3A1 از کیت ELISA (Bioassay Technology Laboratory, China) استفاده شد. در هر چاهک از پلیت 96 خانه‌ای، 40 μL از نمونه‌ها و 50 μL از محلول استاندارد افزوده شد. سپس 50 μL از محلول Streptavidin-HRP conjugate و 10 μL از آنتی‌بادی اختصاصی به هر چاهک اضافه گردید. پلیت‌ها با درپوش مخصوص پوشانده شده و به مدت 1 ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند.

پس از آن، محلول شست‌وشو (Wash Buffer) به چاهک‌ها افزوده و پس از 30 ثانیه خارج گردید. این مرحله چهار مرتبه تکرار شد. در ادامه، به هر چاهک 50 μL از محلول Chromogen A و سپس 50 μL از محلول Chromogen B افزوده شد و پلیت به مدت 10 دقیقه در تاریکی و دمای 37°C انکوبه گردید. واکنش با افزودن Stop Solution متوقف شد که

1. Iivak & Schmittgen



شکل ۱. مراحل نهایی آزمون ELISA برای تعیین غلظت پروتئین Col3a1 در نمونه‌های بافت کبد رت‌های پیر مبتلا به MASLD

ژن BIP در گروه پیر مبتلا به (MASLD کنترل بیمار) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم پیر افزایش یافت. ($p < 0.05$) این افزایش بیان نشان‌دهنده‌ی فعال‌شدن مسیرهای استرس شبکه آندوپلاسمی در بافت کبد رت‌های پیر مبتلا به MASLD است.

در گروهی که تنها تمرین شنا انجام داده بودند، میزان بیان ژن BIP نسبت به گروه بیمار کاهش یافت، هرچند این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). در حالی‌که در گروه تمرین شنا همراه با مصرف مکمل سیلیمارین و ویتامین C، کاهش معنی‌دار بیان ژن BIP نسبت به گروه بیمار مشاهده شد ($p < 0.05$).

به‌طور کلی، نتایج نشان دادند که مداخله ترکیبی تمرین شنا و مکمل آنتی‌اکسیدانی موجب تعدیل بیان

تجزیه و تحلیل داده‌های تحقیق

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه^۱ و دوطرفه^۲ استفاده گردید. سطح اطمینان آزمون‌ها ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. همچنین برای بررسی اختلاف میانگین ΔCt بین گروه‌ها، از آزمون One-Way ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها

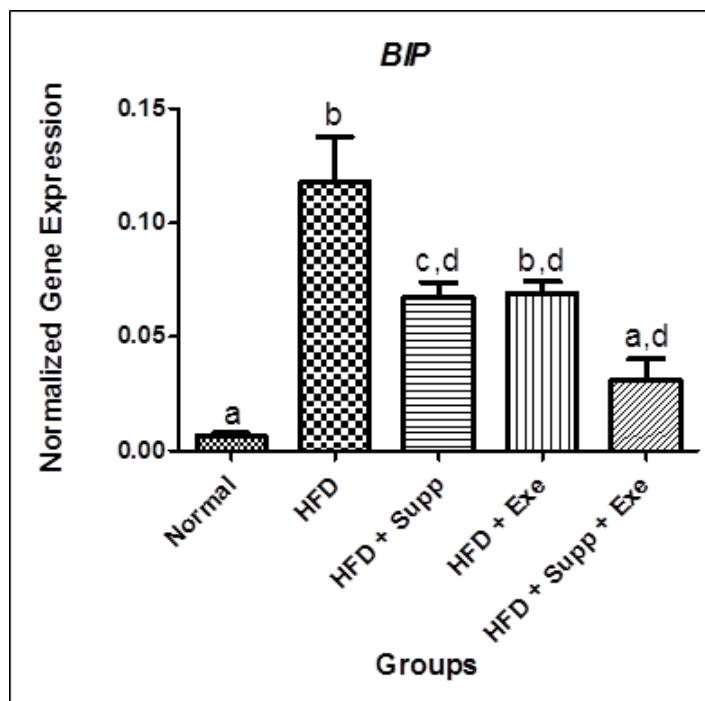
نتایج میزان بیان ژن BIP

بر اساس نتایج کمی به‌دست‌آمده از Real-Time PCR که در نمودار ۱ به آن اشاره شده، میزان بیان

². Two-Way ANOVA

¹. One-Way ANOVA

ژن BIP و در نتیجه کاهش استرس سلولی در کبد رت‌های پیر مبتلا به MASLD گردید، در حالی که در گروه‌های فاقد مداخله، بیان این ژن بالا باقی ماند.



نمودار ۱. میزان بیان ژن CHOP در پنج گروه مورد بررسی

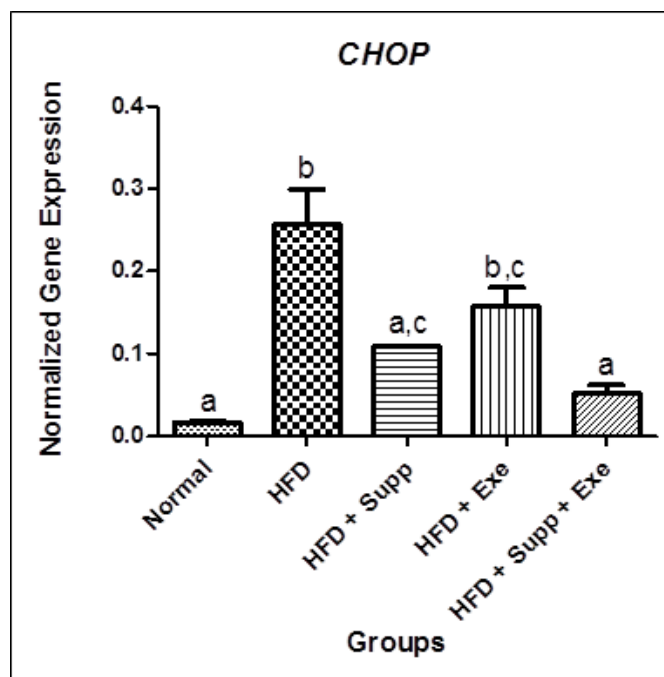
معنی‌داری در بیان ژن CHOP نسبت به گروه بیمار مشاهده شد ($p < 0.05$).

به‌طور کلی، نتایج نشان دادند که هر دو مداخله‌ی تمرین شنا و مصرف مکمل آنتی‌اکسیدانی به‌صورت مستقل سبب کاهش بیان ژن CHOP شدند و این تغییر می‌تواند در کاهش آپوپتوز و التهاب بافت کبدی رت‌های پیر مبتلا به MASLD نقش داشته باشد.

نتایج میزان بیان ژن CHOP

بر اساس نتایج حاصل از Real-Time PCR که در نمودار ۲ به آن اشاره شده، میزان بیان ژن CHOP در گروه پیر مبتلا به MASLD (کنترل بیمار) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم پیر افزایش یافت ($p < 0.05$). این افزایش بیان نشان‌دهنده‌ی فعال شدن مسیرهای استرس آندوپلاسمی و آپوپتوز سلولی در کبد رت‌های پیر بیمار است.

در گروهی که تنها تمرین شنا انجام داده بودند، میزان بیان ژن CHOP کاهش یافت، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با گروه بیمار نداشت ($p > 0.05$). همچنین در گروهی که تمرین شنا همراه با مصرف مکمل سیلیمارین و ویتامین C دریافت کردند، کاهش



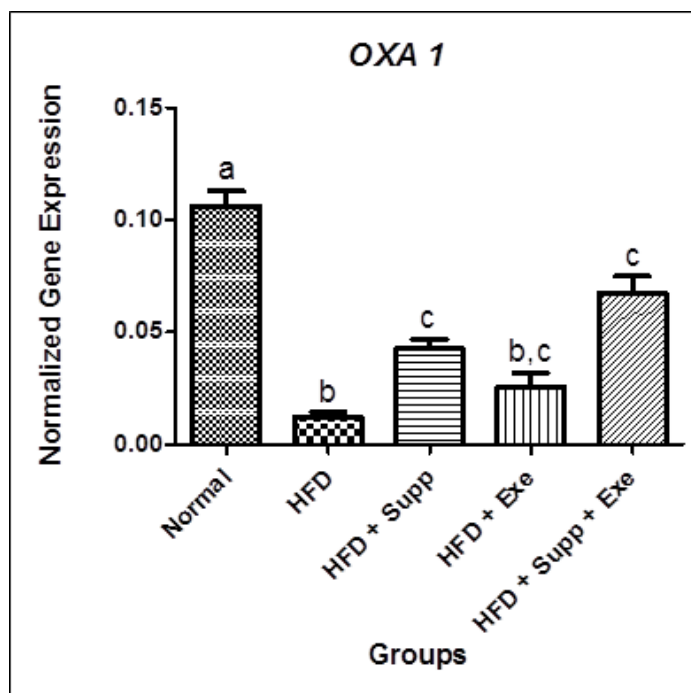
نمودار ۲. میزان بیان ژن CHOP در ۵ گروه مورد بررسی پژوهش

نتایج میزان بیان ژن OXA1

بیان ژن OXA1 و در نتیجه افزایش کارایی میتوکندری در رت‌های پیر مبتلا به MASLD گردید. این تغییرات می‌تواند نشانگر نقش محافظتی این مداخلات در بازسازی عملکرد سلولی و جلوگیری از افت انرژی در سلول‌های کبدی باشد.

بر اساس نتایج حاصل از Real-Time PCR که در نمودار ۳ به آن اشاره شده، میزان بیان ژن OXA1 در گروه پیر مبتلا به MASLD (کنترل بیمار) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم پیر کاهش یافت ($p < 0.05$). این کاهش بیان نشان‌دهنده‌ی تضعیف فعالیت میتوکندریایی و کاهش پایداری پروتئین‌های غشایی در کبد رت‌های پیر مبتلا به MASLD است. در گروهی که تنها تمرین شنا انجام داده بودند، میزان بیان ژن OXA1 اندکی افزایش یافت ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). در مقابل، در گروه تمرین شنا همراه با مصرف مکمل سیلیمارین و ویتامین C، افزایش معنی‌داری در بیان ژن OXA1 نسبت به گروه بیمار مشاهده شد ($p < 0.05$).

به طور کلی، نتایج نشان دادند که مداخله‌ی ترکیبی تمرین شنا و مصرف مکمل آنتی‌اکسیدانی باعث بهبود



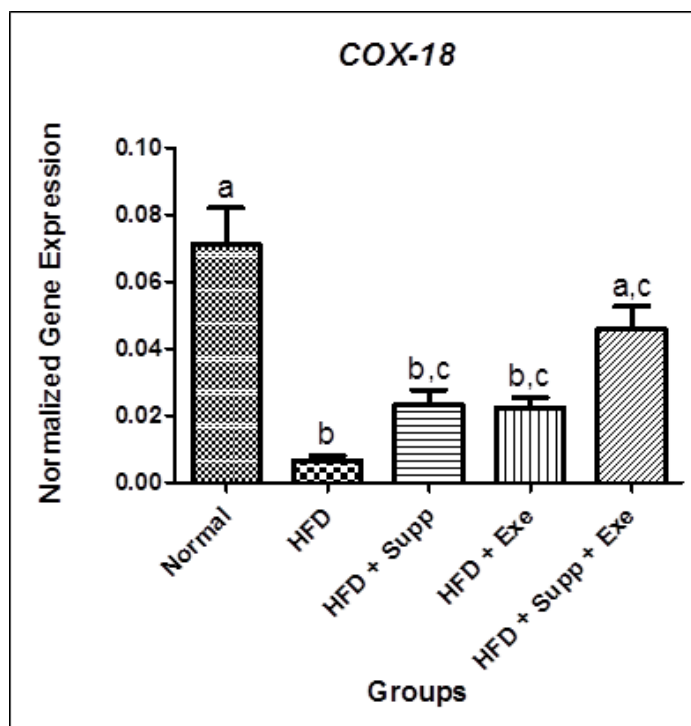
نمودار ۳. میزان بیان ژن OXA1 در ۵ گروه مورد بررسی پژوهش

نتایج میزان بیان ژن COX-18

بر اساس نتایج حاصل از Real-Time PCR که در نمودار ۴ به آن اشاره شده، میزان بیان ژن COX-18 در گروه پیر مبتلا به MASLD (کنترل بیمار) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم پیر کاهش یافت ($p < 0.05$). این یافته نشان‌دهنده اختلال در فعالیت زنجیره انتقال الکترون و عملکرد میتوکندری در رت‌های پیر بیمار است.

در گروهی که تنها تمرین شنا انجام داده بودند، میزان بیان ژن COX-18 اندکی افزایش یافت، اما این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). در گروه تمرین شنا همراه با مصرف مکمل سیلیمارین و ویتامین C، بیان ژن COX-18 افزایش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار نشان داد ($p < 0.05$) و به سطح نزدیک به گروه کنترل سالم رسید.

به‌طور کلی، نتایج نشان دادند که مداخله‌ی ترکیبی تمرین شنا و مصرف مکمل آنتی‌اکسیدانی موجب بهبود بیان ژن COX-18 گردید؛ عاملی که می‌تواند به افزایش کارایی میتوکندری و بهبود عملکرد انرژی‌زایی در کبد رت‌های پیر مبتلا به MASLD منجر شود.



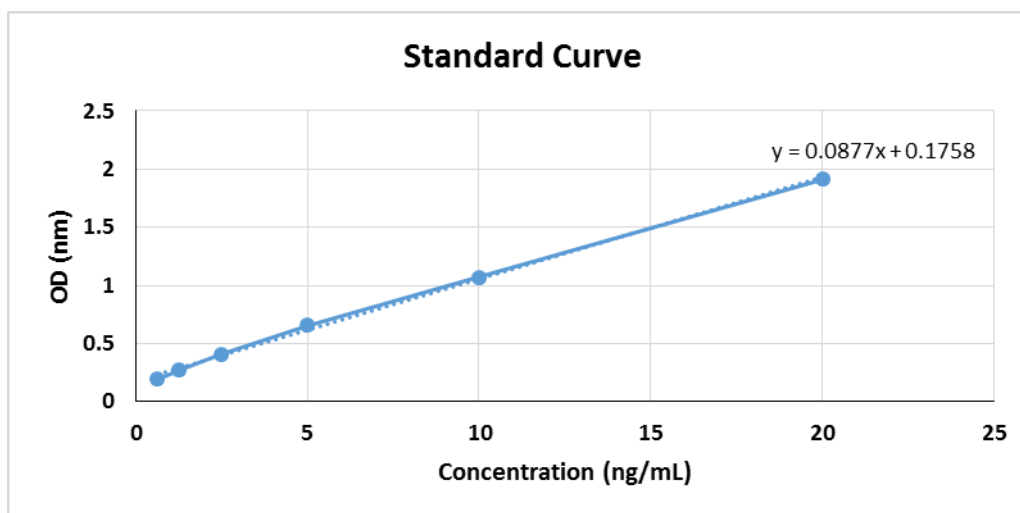
نمودار ۴. میزان بیان ژن COX-18 در پنج گروه مورد بررسی

به‌طور کلی، نتایج نشان دادند که ترکیب تمرین شنا و مکمل آنتی‌اکسیدانی اثر هم‌افزایی داشته و می‌تواند نسبت به مداخله‌ی منفرد، کاهش مؤثرتری در غلظت Col3A1 و شدت فیبروز کبدی در رت‌های پیر مبتلا به MASLD ایجاد کند.

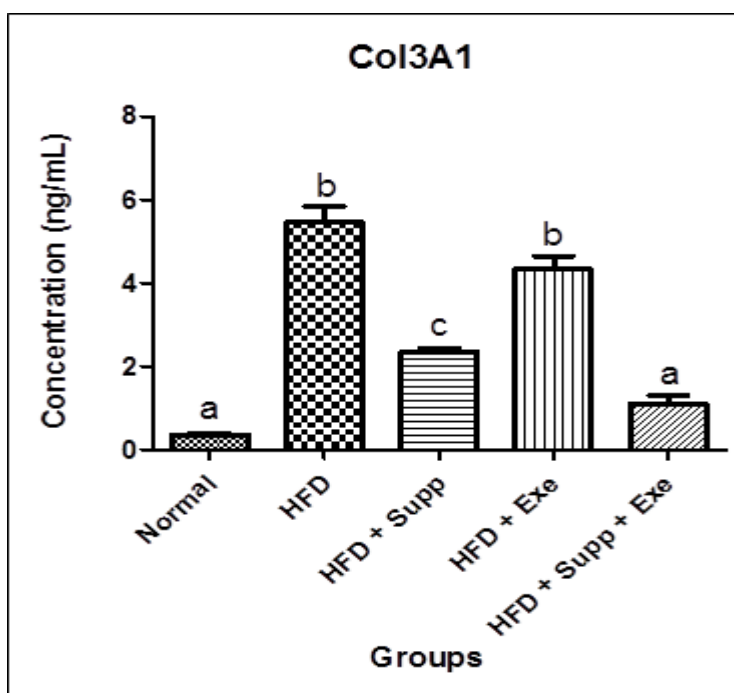
نتایج آزمون الایزا (میزان غلظت Col3A1)

بر اساس نتایج حاصل از آزمون ELISA بر اساس نمودار ۵ و ۶، غلظت پروتئین Col3A1 در گروه پیر مبتلا به MASLD (کنترل بیمار) نسبت به گروه کنترل سالم پیر افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). این افزایش بیانگر تشدید فرآیند فیبروز کبدی در رت‌های پیر مبتلا به MASLD است.

در گروهی که تنها مکمل ترکیبی (سیلیمارین + ویتامین C) دریافت کردند، غلظت Col3A1 کاهش یافت، هرچند این کاهش از نظر آماری در سطح محدود باقی ماند ($p > 0.05$). در مقابل، در گروهی که تمرین شنا همراه با مصرف مکمل داشتند، غلظت Col3A1 کاهش چشم‌گیری نسبت به سایر گروه‌ها از جمله گروه مکمل به‌تنهایی مشاهده شد ($p < 0.05$).



نمودار ۵. منحنی استاندارد غلظت Col3A1



نمودار ۶. میزان غلظت Col3A1 در پنج گروه مورد بررسی پژوهش

بحث و نتیجه‌گیری

بافتی، تسریع روند فیروز کبد و در نهایت تخریب عملکرد آن گردد (۲۱). روش‌های درمانی مختلفی برای این بیماری پیشنهاد شده است (۲۲). که در میان آن‌ها، فعالیت بدنی منظم یکی از مؤثرترین مداخلات غیر دارویی محسوب می‌شود. ورزش به‌عنوان محرک

بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک (MASLD) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی در سالمندان محسوب می‌شود که می‌تواند همراه با هپاتیت‌های ویروسی منجر به افزایش آسیب

شاخص‌های التهابی و بهبود عملکرد کبد در موش‌های پیر شد (۳۲). در واقع، ژن BIP به‌عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های مهم هموستاز شبکه آندوپلاسمی، در شرایط استرس اکسیداتیو فعال‌تر می‌شود (۳۳) و کاهش بیان آن پس از مداخله نشانه‌ای از کاهش استرس سلولی است.

بیان ژن CHOP نیز تحت تأثیر تمرین و مصرف مکمل به‌صورت مستقل کاهش یافت. این ژن، که توسط DDIT3 کد می‌شود، در مسیر آپوپتوز و پاسخ استرس سلولی نقش دارد (۳۴-۳۵). در پژوهش حاضر، تمرین و مکمل هر دو منجر به کاهش بیان CHOP در رت‌های پیر شدند، اما اثر تعاملی میان آن‌ها مشاهده نگردید. این نتایج نشان می‌دهد که هر مداخله به‌تنهایی می‌تواند پاسخ استرس آندوپلاسمی را تعدیل کند.

در مورد ژن Cox18 نیز هر دو مداخله اثر مستقل و معنی‌داری نشان دادند، اما اثر تعاملی وجود نداشت. Cox18 یکی از اجزای کلیدی زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری است که در تنظیم سنتز کمپلکس سیتوکروم اکسیداز نقش دارد. یافته‌های این پژوهش با گزارش فدریکو و همکاران^۲ مطابقت دارد که اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی سیلیمارین را در کاهش آسیب کبدی گزارش کردند (۳۶). با توجه به نقش حیاتی COX در تنفس سلولی و تولید ATP، کاهش اختلال در بیان آن می‌تواند به بهبود کارایی متابولیکی کبد منجر شود (۳۷-۳۸).

بیان ژن Oxa1 نیز در نتیجه‌ی تمرین و مصرف

فیزیولوژیکی قوی، مصرف ATP و اکسیداسیون سوبسترا را افزایش می‌دهد؛ این فرآیند محدود به عضله‌ی فعال نیست و کبد نیز به‌دنبال آن درگیر افزایش متابولیسم و تبادل اکسیژن می‌شود. مطالعات انسانی و حیوانی نشان داده‌اند که در طول ورزش استقامتی، مصرف اکسیژن کبد تا دو برابر افزایش می‌یابد (۳۱-۳۳) که نشانه‌ای از فعالیت متابولیکی بیشتر و تقاضای بالاتر ATP است. با وجود پیشرفت در شناخت مکانیسم‌های سلولی مرتبط با MASLD، هنوز درمان استاندارد و قطعی برای این بیماری چندعاملی وجود ندارد.

در این پژوهش اثر یک دوره تمرین شنا به همراه مصرف مکمل ترکیبی (سیلیمارین و ویتامین C) بر بیان ژن‌های BIP، CHOP، Cox18، Oxa1 و غلظت Col3A1 در رت‌های پیر مبتلا به MASLD بررسی شد.

نتایج نشان داد که اثر اصلی تمرین بر بیان ژن BIP معنی‌دار بود، به‌طوری‌که تمرین شنا موجب کاهش بیان این ژن در رت‌های پیر گردید ($p < 0.05$). همچنین مصرف مکمل به‌تنهایی نیز اثر معنی‌داری بر کاهش بیان این ژن داشت ($p = 0.006$). با این حال، اثر تعاملی تمرین و مکمل بر بیان BIP معنی‌دار نبود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سیلیمارین، به‌عنوان ترکیب فعال اصلی مکمل، می‌تواند تا حدودی استرس شبکه آندوپلاسمی را کاهش دهد. این نتایج با مطالعه‌ی هوانگ و همکاران^۱ (۲۰۱۳) همسو است که نشان دادند تمرین شنا ۱۲ هفته‌ای موجب کاهش

2. Federico et al

1. Hang et al

بر اساس یافته‌های این پژوهش، تمرین شنا و مصرف مکمل ترکیبی سیلیمارین و ویتامین C هر کدام به صورت مستقل بر بهبود شاخص‌های مولکولی کبد در رت‌های پیر مبتلا به MASLD مؤثر بودند. نتایج نشان دادند که هر یک از این مداخلات به تنهایی باعث کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های BIP، CHOP، Cox18 و Col3A1 و نیز افزایش بیان ژن Oxa1 شدند. این تغییرات بیانگر کاهش استرس آندوپلاسمی، بهبود عملکرد میتوکندری و مهار روند فیبروز در بافت کبدی است.

با این حال، هیچ اثر تعاملی (سینرژیکی) بین تمرین شنا و مصرف مکمل مشاهده نشد؛ بدین معنا که ترکیب دو مداخله در کنار هم، تأثیر افزوده‌ای نسبت به اجرای هر کدام به تنهایی نداشت. این نتیجه نشان می‌دهد که مسیرهای مولکولی اثر تمرین و مکمل، احتمالاً به صورت مستقل و از طریق مکانیسم‌های متفاوتی عمل می‌کنند.

با توجه به اینکه پیری با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های متابولیک مرتبط با کبد همراه است، استفاده از راهکارهای غیردارویی و غیرتهاجمی همچون فعالیت‌های ورزشی منظم و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در پیشگیری یا کنترل MASLD نقش مؤثری داشته باشد. بنابراین، توصیه می‌شود در مطالعات آینده، تأثیر سایر مدل‌های تمرینی، دوزهای مختلف مکمل، و طول دوره‌های مداخله با طراحی‌های طولی و نمونه‌های انسانی بررسی شود تا مکانیسم دقیق اثرات مستقل و ترکیبی این

مکمل به صورت مستقل افزایش یافت. نتایج نشان داد که تمرین و مکمل هر دو سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن Oxa1 شدند، اما اثر تعاملی مشاهده نگردید. بر اساس پژوهش لی و همکاران (۲۰۱۹)، مصرف سیلیمارین همراه با ویتامین E و رژیم کم‌چرب باعث بهبود شاخص‌های MASLD می‌شود (۳۹). افزایش بیان Oxa1 ممکن است با تقویت عملکرد میتوکندری و افزایش بازسازی پروتئین‌های غشایی مرتبط باشد.

در نهایت، نتایج ELISA نشان داد که تمرین و مکمل هر دو به صورت مستقل موجب کاهش معنی‌دار غلظت پروتئین Col3A1 در بافت کبد رت‌های پیر مبتلا به MASLD شدند، در حالی که اثر تعاملی بین دو مداخله وجود نداشت. این یافته‌ها با مطالعه‌ی ژانگ و همکاران^۱ همسو است که نشان دادند سیلیمارین از طریق مهار مسیر NF-κB و کاهش بیان IL-6 و ICAM-1 موجب کاهش التهاب و فیبروز کبدی می‌شود (۴۰). با توجه به اینکه Col3A1 یکی از کلاژن‌های فیبریلار اصلی است که حدود ۵ تا ۲۰ درصد کل کلاژن بدن را تشکیل می‌دهد (۴۱)، کاهش غلظت آن نشانه‌ی مهار روند فیبروز و بهبود ساختار بافت کبدی است.

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که ورزش شنا و مصرف مکمل آنتی‌اکسیدانی هر کدام به صورت مستقل اثر حفاظتی بر کبد رت‌های پیر مبتلا به MASLD دارند، اما ترکیب آن‌ها اثر هم‌افزایی نشان نداد. این امر احتمالاً به تفاوت در مسیرهای مولکولی اثر هر مداخله مربوط است.

1. Zhang et al

مشارکت نویسندگان	عوامل مشخص گردد.
همه نویسندگان در نگارش این مقاله مشارکت یکسانی داشتند.	تشکر و قدردانی
تعارض منافع	نویسندگان بدینوسیله از همه کسانی که در انجام این پژوهش مشارکت کرده و زمینه انجام آن را فراهم کردند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌کنند.
هیچگونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.	حمایت مالی
	برای انجام پژوهش حاضر هیچگونه حمایت مالی دریافت نشده است.

References

1. Kim IH, Kisseleva T, Brenner DA. Aging and liver disease. Current opinion in gastroenterology. 2015; 31(3): 184-91.
2. Gong Z, Tas E, Yakar S, Muzumdar R. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging. Molecular and cellular endocrinology. 2017; 455: 115-30.
3. Whitsett M, VanWagner LB. Physical activity as a treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. World journal of hepatology. 2015; 7(16): 2041.
4. Ruan L, Li F, Li S, Zhang M, Wang F, Lv X, Liu Q. Effect of Different Exercise Intensities on Hepatocyte Apoptosis in HFD-Induced NAFLD in Rats: The Possible Role of Endoplasmic Reticulum Stress through the Regulation of the IRE1/JNK and eIF2 α /CHOP Signal Pathways. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2021;2021(1):6378568.
5. Shamsoddini A, Sobhani V, Chehreh MEG, Alavian SM, Zaree A. Effect of aerobic and resistance exercise training on liver enzymes and hepatic fat in Iranian men with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatitis monthly. 2015; 15(10).
6. Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, Takahashi M, Oyanagi E, Suzuki K. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. Brain, behavior, and immunity. 2012; 26(6): 931-41.
7. Huang N, Peng L, Huang E, Qin Y, Li H, Liao J, Wang Y, Shi L, Sun L. Apigenin combined with aerobic exercise alleviates oxidative stress and inflammation in high-fat diet-induced NAFLD mice by modulating the Keap1/Nrf2/ARE pathway. Scientific Reports. 2026 Mar 21.
8. Yang K, Liu C, Shao J, Guo L, Wang Q, Meng Z, Jin X, Chen X. Would combination be better: swimming exercise and intermittent fasting improve high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in obese rats via the miR-122-5p/SREBP-1c/CPT1A

- pathway. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2024 Dec 31:1675-86.
9. Barzegarzadeh ZH, Dabidy RV. Changes in some liver enzymes and blood lipid level following interval and continuous regular aerobic training in old rats. 2013
 10. Stickel F, Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. *Digestive and liver disease*. 2007; 39(4): 293-304.
 11. Toklu HZ, Tunalı-Akbay T, Erkanlı G, Yüksel M, Ercan F, Şener G. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. *Burns*. 2007; 33(7): 908-16.
 12. Radko L, Cybulski W. Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2007; 1(1).
 13. Qian X, Wang T, Gong J, Wang L, Chen X, Lin H, Tu W, Jiang S, Li S. Exercise in mice ameliorates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by lowering HMGCS2. *Aging (Albany NY)*. 2021 Mar 1;13(6):8960.
 14. Jowhari A, Daryanoosh F, Koushkie Jahromi M, Nekooeian A A. Effect of High-intensity Intermittent Swimming Training on peroxisome proliferator-activated receptors- α and Liver Enzymes in Non-alcoholic Steatohepatitis Male Rats. *JSSU* 2023; 30 (10) :6034-6051.[In Persian]
 15. Delavari, M. A., Shahabpour, E., Jowhari, A. The effect of eight weeks of high-intensity interval swimming training on the expression of liver RBP4 protein, serum hs-CRP and insulin resistance in rats with Non-Alcoholic Steatohepatitis caused by consumption of high-fat diet. *Journal of Sport and Exercise Physiology*, 2024; 17(3): 71-90. [In Persian]
 16. Bahrani S M N, Rahmati S, Moqadam V. Effect of Eight Weeks of High-Intensity Interval Swimming on Visceral Adipose Tissue Asprosin and Serum Adiponectin in Rats with High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2024; 34 (237) :1-13. [In Persian]
 17. Reddy JK, Sambasiva Rao M. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006; 290(5): G852-G8.
 18. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346(16): 1221-31.
 19. Chang Y, Ryu S, Sung E, Jang Y. Higher concentrations of alanine aminotransferase within the reference interval predict nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical chemistry*. 2007; 53(4): 686-92.
 20. Mokhtari-Andani F, Talebi-Garakani E, Nasiri K, Akbari A. Exercise training and Silymarin consumption can ameliorate mitophagy signaling flux in hepatocytes of rats with dexamethasone-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*. 2025 Oct

- 21;15(1):36637.
21. Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003; 38(4): 999-1007.
 22. Rieusset J. Endoplasmic reticulum-mitochondria calcium signaling in hepatic metabolic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2017; 1864(6): 865-76.
 23. Takahashi H, Kotani K, Tanaka K, Eguchi Y, Anzai K. Therapeutic approaches to nonalcoholic fatty liver disease: exercise intervention and related mechanisms. *Frontiers in Endocrinology*. 2018; 9: 588.
 24. Rinella ME, Sookoian S. From NAFLD to MASLD: updated naming and diagnosis criteria for fatty liver disease. *Journal of lipid research*. 2023; 77(1): 120-134.
 25. Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Experimental and toxicologic pathology*. 2012; 64(4): 273-82.
 26. Zacarias AC, Barbosa MA, Guerra-Sá R, De Castro UG, Bezerra FS, de Lima WG, Cardoso LM, Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Swimming training induces liver adaptations to oxidative stress and insulin sensitivity in rats submitted to high-fat diet. *Redox Report*. 2017 Nov 2; 22(6): 515-23.
 27. da Silva LA, Pinho CA, Rocha LG, Tuon T, Silveira PC, Pinho RA. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2009; 34(1): 60-5.
 28. Aghaei F, Wong A, Zargani M, Sarshin A, Feizolahi F, Derakhshan Z, Hashemi M, Arabzadeh E. Effects of swimming exercise combined with silymarin and vitamin C supplementation on hepatic inflammation, oxidative stress, and histopathology in elderly rats with high-fat diet-induced liver damage. *Nutrition*. 2023; 115: 112167.
 29. Zhao Y, Li H. Association of serum vitamin C with liver fibrosis in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2022; 57(7): 872-7.
 30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 2001; 25(4): 402-8.
 31. Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, Takano Y, Ueno T, Koga H, George J, Shiba N, Torimura T. Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *Journal of hepatology*. 2017; 66(1): 142-52.
 32. Huang CC, Chiang WD, Huang WC, Huang CY, Hsu MC, Lin WT. Hepatoprotective effects of swimming exercise against D-galactose-induced senescence rat model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013(1): 275431.

33. Anttonen AK, Mahjneh I, Hämäläinen RH, Lagier-Tourenne C, Kopra O, Waris L, Anttonen M, Joensuu T, Kalimo H, Paetau A, Tranebjaerg L, Chaigne D, Koenig M, Eeg-Olofsson O, Udd B, Somer M, Somer H, Lehesjoki AE. The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. *Nature genetics*. 2005; 37(12): 1309-11.
34. Klein-Platat C, Drai J, Oujaa M, Schlienger JL, Simon C. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. *The American journal of clinical nutrition*. 2005; 82(6): 1178-84.
35. Yao Y, Lu Q, Hu Z, Yu Y, Chen Q, Wang QK. A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure. *Nature communications*. 2017; 8(1): 133.
36. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years. *Molecules*. 2017; 22(2): 191.
37. Xu J, Shen J, Yuan R, Jia B, Zhang Y, Wang S, Zhang Y, Liu M, Wang T. Mitochondrial targeting therapeutics: promising role of natural products in non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2021; 12: 796207.
38. Sinkler CA, Kalpage H, Shay J, Lee I, Malek MH, Grossman LI, Hüttemann M. Tissue-and condition-specific isoforms of mammalian cytochrome c oxidase subunits: from function to human disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017; 2017(1): 1534056.
39. Li Z, Li Y, Zhang HX, Guo JR, Lam CWK, Wang CY, Zhang W. Mitochondria-mediated pathogenesis and therapeutics for non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular nutrition & food research*. 2019; 63(16): 1900043.
40. Zhang W, Hong R, Tian T. Silymarin's protective effects and possible mechanisms on alcoholic fatty liver for rats. *Biomolecules & therapeutics*. 2013; 21(4): 264.
41. Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*. 2019; 707: 151-71.