Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

The effect of High-intensity interval training with *Portulaca oleracea* Hydroalcoholic extract on gene expression of Selenoprotein P (SeP) and insulin resistance in rats with nonalcoholic fatty liver

Zohre Hosseini[1], Sadegh Cheragh-Birjandi[2]*

ABSTRACT

Background and Aims: Non-alcoholic fatty liver disease is the accumulation of triglycerides in the liver. Modifying lifestyle, especially exercise and nutrition, are ways to control this disease. The present study aimed to investigate the effect of high-intensity interval training (HIIT) and consumption of *Portulaca Oleracea* extract on Selenoprotein P gene expression and insulin resistance in rats with non-alcoholic fatty liver disease.

Materials and Methods: In this experimental study, 25 Wistar male rats with a weight range of 160-185 g were prepared and randomly divided into five groups of (n=5) (1. Control, 2. Control fatty liver, 3. HIIT, 4. *Portulaca Oleracea* extract, and 5. HIIT+Portulaca Oleracea extract). The non-alcoholic fatty liver model was induced in rats by following a high-fat diet for weeks. The training protocol consisted of 8 weeks of HIIT training and consumption of *Portulaca Oleracea* extract. Data analysis was performed using SPSS software (version 24) and one-way analysis of variance. Moreover, Tukey's post hoc tests were used to compare differences between groups.

Results: The obtained results showed that eight weeks of HIIT and consumption of *Portulaca Oleracea* extract significantly affected the level of Selenoprotein P and insulin resistance in a way that the level of both factors Selenoprotein P and insulin resistance after HIIT and consumption of *Portulaca Oleracea* extract was lower than the fatty liver control group (P=0.001).

Conclusion: Based on the findings, HIIT alone and accompanied by the consumption of *Portulaca Oleracea* extract positively affected the amount of Selenoprotein P and insulin resistance in rats with fatty liver. The HIIT alone and accompanied by the consumption of *Portulaca Oleracea* extract can reduce the disease complications.

Keywords: High-intensity interval training, Insulin resistance, Non-alcoholic fatty liver disease, *Portulaca oleracea* extract, Selenoprotein P (SeP)

Citation: Hosseini Z, Cheragh-Birjandi S. [The effect of High-intensity interval training with *Portulaca oleracea* Hydroalcoholic extract on gene expression of Selenoprotein P (SeP) and insulin resistance in rats with nonalcoholic fatty liver]. J Birjand Univ Med Sci. 2023; 30(3): 257-267. [Persian]

DOI 10.61186/JBUMS.30.3.257

Received: July 5, 2023 **Accepted:** December 14, 2023

[1] MA in asters, Department of Exercise Physiology, Bojnourd Bbranch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran
[2] Department of Exercise Physiology, Bojnourd Bbranch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

* **Corresponding author:** Department of Exercise Physiology, Bojnourd Bbranch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran
Tel: +9891536225952 Fax: +985632296977 E-mail: s_birjandi2001@yahoo.com / Sadeghbirjandi61@gmail.com

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

مقاله اصیل پژوهشی

تأثیر تمرینات تناوبی شدید همراه با مصرف عصاره هیدروالکلی خرفه بر بیان ژن سلنوپروتئین P (SeP) و مقاومت به انسولین در موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

زهره حسینی[1]، صادق چراغ بیرجندی[2]*

چکیده

زمینه و هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی تجمع تری‌گلیسیرید در کبد است. روش کنترل این بیماری اصلاح سبک زندگی به ویژه ورزش و تغذیه است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر یک دوره تمرینات تناوبی شدید (High-intensity interval training/ HIIT) و مصرف عصاره خرفه بر مقادیر بیان ژن سلنو پروتئین P و مقاومت به انسولین در موش‌های دارای کبد چرب غیرالکلی بود.

روش تحقیق: مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. ۲۵ سر رت نر نژاد ویستار با دامنه وزنی ۱۶۰ تا ۱۸۵ گرم تهیه شد و به صورت تصادفی در ۵ گروه ۵ تایی (۱- سالم، ۲- کنترل کبد چرب، ۳- تمرین، ۴ - خرفه، ۵- تمرین+ خرفه) تقسیم شدند. رت‌ها با مصرف رژیم غذایی پرچرب مبتلا به کبد چرب غیر الکلی شدند. پروتکل تمرینی شامل ۸ هفته تمرین HIIT و مصرف عصاره خرفه بود. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز واریانس یک‌طرفه با سطح معناداری P<۰/۰۵ انجام شد و برای مقایسه تفاوت‌های بین گروهی از آزمون‌های تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: ۸ هفته تمرین و مصرف عصاره خرفه تأثیر معناداری بر سطح سلنو پروتئین P و مقاومت به انسولین داشت؛ به‌طوری که سطح هر دو فاکتور سلنو پروتئین P و مقاومت به انسولین پس از تمرین و مصرف مکمل خرفه پایین‌تر از گروه کنترل کبد چرب بود (P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مطالعه نشان داد تمرینات تناوبی با شدت HIIT به تنهایی و همراه مصرف عصاره خرفه تأثیر مثبتی بر میزان سلنوپروتئین پی و مقاومت به انسولین در موش‌های دارای کبد چرب دارد این تمرینات به تنهایی و همراه با مصرف عصاره خرفه می‌تواند در جهت کاهش عوارض بیماری یاری‌رسان باشند.

واژه‌های کلیدی: تمرینات تناوبی شدید، مقاومت به انسولین، کبد چرب غیرالکلی، عصاره خرفه، سلنوپروتئین P

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۲؛ ۳۰ (۳): ۲۶۷-۲۵۷.

دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۳

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

[2] گروه علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

آدرس: بجنورد- خیابان دانشگاه- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد- دانشکده علوم انسانی

تلفن: ۰۹۱۵۳۶۲۲۵۹۲ نمابر: ۰۵۶۳۲۲۹۶۹۷۷ پست الکترونیکی: s_birjandi2001@yahoo.com

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD[1]) در اثر تجمع بیش از اندازه تری‌گلیسرید (بیش از ۵٪ وزن کبد) در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی در غیاب مصرف الکل رخ می‌دهد (۱). این بیماری شامل طیف گسترده‌ای از بیماری‌های کبدی است که در اولین مرحله به صورت کبد چرب ساده (استئاتوز) است و سپس به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH[2]) تبدیل و در نهایت به سیروز کبدی منجر می‌شود. تاکنون مهم‌ترین فرضیه مطرح شده در خصوص پاتوژنز بیماری، فرضیه «چندضربه‌ای[3]» است که بر اساس آن، مقاومت انسولینی (IR[4]) به عنوان اولین ضربه منجر به افزایش لیپوژنز کبدی، کاهش اکسیداسیون کبدی اسیدهای چرب و کاهش خروج چربی از کبد و در نتیجه تجمع چربی در کبد می‌شود (۲).

مقاومت به انسولین وضعیتی است که در آن سلول‌های بدن نسبت به اثرات انسولین مقاوم می‌شوند (۳). بیماران سیروز کبدی دارای شیوع بالایی از دیابت شیرین و مقاومت به انسولین هستند (۴).

هپاتوکین‌ها عوامل جدیدی هستند که شبیه به هورمون از کبد آزاد می‌شوند. سلنوپروتئین P (SeP[5]) اخیراً به‌عنوان یک هپاتوکین جدید که مقاومت به انسولین و متابولیسم انرژی سیستماتیک را در جوندگان و انسان تنظیم می‌کند شناخته شده است (۵). در مطالعات اخیر مشخص شد سطوح SeP در گردش در افراد مبتلا به NAFLD و همچنین در افراد مبتلا به چاقی احشایی افزایش یافت و ممکن است نشانگر زیستی جدیدی برای NAFLD باشد. (۵). اخیراً Misu H و همکاران دریافتند که تجویز SeP مقاومت به انسولین را در سلول‌های کبدی و میوسیت‌ها تشدید کرد. در مقابل، هم حذف ژنتیکی و هم از بین رفتن با واسطه تداخل RNA از SeP، حساسیت به انسولین و تحمل گلوکز را در موش بهبود بخشید. بنابراین، آنها به این نتیجه رسیدند که SeP ممکن است یک هدف امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های مرتبط با مقاومت به انسولین باشد (۶).

بیوسنتز SeP کبدی توسط انسولین سرکوب شده و با غلظت‌های بالای گلوکز افزایش می‌یابد (۷). در افراد سالم از نظر متابولیکی، انسولین رونویسی ژن FoxO1[6] و HNF-4α[7] را خاموش می‌کند. تحت شرایط غلظت بالای گلوکز خارج سلولی و مقاومت به انسولین، فعالیت رونویسی نامنظم FoxO1 باعث افزایش بیوسنتز SeP و آنزیم‌های گلوکونئوژنیک می‌شود که منجر به افزایش سطوح SeP پلاسما و همچنین در یک چرخه معیوب افزایش بیشتر گلوکز پلاسما می‌شود (۸).

از آنجایی که داروی قطعی برای درمان بیماری کبد چرب غیر الکلی وجود ندارد؛ رویکرد درمان این بیماری بیشتر کنترل است تا دارو؛ بنابراین تغییر سبک زندگی با افزایش فعالیت بدنی و تغذیه مناسب در بهبود این بیماری مفید است (۹).

تمرینات تناوبی شدید که شامل دوره های فعالیت بدنی با شدت بالا به همراه استراحت فعال با شدت پایین می‌باشد، امروزه از نظر زمانی، یک شیوه بسیار کار آمد بوده که سازگاری‌های متابولیکی زیادی از جمله بهبود فاکتورهایی چون نیم رخ لیپیدی، کاهش وزن در اثر تجزیه چربی‌های شکمی، حفظ توده عضلانی و افزایش حساسیت انسولینی به دلیل آمادگی بیشتر عضلات برای مصرف گلوکز را تحریک می‌کند (۱۰).

تولید Ros[8] با واسطه ورزش اثرات تمرین ورزشی را بر فعال کردن AMPK[9] و PGC-1α[10] در عضله اسکلتی میانجی‌گری می‌کند. ممکن است افزایش سطح SeP در افراد دیابتی و دارای کبد چرب تولید Ros ناشی از ورزش را از بین ببرد و در نتیجه اثرات بهبود دهنده سلامت ورزش را کاهش دهد (۱۱). AMPK با قرار گرفتن در معرض حاد با Ros (۱۲) فعال می‌شود و PGC-1α را تنظیم می‌کند که نقش عمده‌ای در سازگاری عضلانی با واسطه ورزش دارد (۱۳).

[1] Non-alcoholic fatty liver disease
[2] Non-alcoholic steatohepatitis
[3] Multi-hit
[4] insulin resistance
[5] Selenoprotein P
[6] Forkhead box transcription factor O1 (FOXO1)
[7] hepatocyte nuclear factor 4α
[8] reactive oxygen species
[9] AMP-activated protein kinase
[10] The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α (PGC-1α)

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

ورزش همچنین پیشرفت دو مرحله‌ای پیشنهادی استئاتوهپاتیت را که در نتیجه به‌هم ریختن متابولیسم اسیدهای چرب و لیپید رخ می‌دهد و منجر به افزایش رسوب و اختلال در خروج لیپیدهای کبدی همراه با لیپوژنز جدید و به دنبال آن افزایش سیتوکین‌های التهابی کبد می‌شود را خنثی می‌کند (۱۴) مطالعات J. L. Talanian و همکاران نشان می‌دهد دو هفته تمرین تناوبی هوازی با شدت بالا باعث افزایش ظرفیت اکسیداسیون چربی در حین ورزش در زنان می شود (۱۵). همچنین مطالعه صادقی و همکارانش نشان داد ۱۲ هفته تمرین استقامتی بر سطح آنزیم‌های کبدی زنان چاق اثری ندارد (۱۶). مطالعه قربانی و همکاران نشان داد اجرای تمرینات تناوبی شدید به عنوان یک راهکار مناسب در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی می‌تواند پیشنهاد شود (۱۷).

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L به عنوان درمان دارویی با حداقل عوارض برای این بیماری در نظر گرفته می‌شود. این گیاه علفی و گوشت‌دار است که تقریباً در تمام مناطق ایران پراکندگی دارد (۱۸). شواهد نشان می‌دهد که تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک از جمله بیماری‌ها مثل کبد چرب سیستم ضد اکسایش اندوژن (آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) تضعیف می‌شوند، در چنین مواقعی نقش مواد آنتی‌اکسیدانی اگزوژن (از قبیل ویتامین E، ویتامین C، امگا ۳ و....) که از طرق رژیم غذایی به‌ویژه مکمل‌های گیاهی باید تأمین شود، اهمیت پیدا می‌کند. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و اسیدهای چرب امگا۳ و امگا۶ موجود در عصاره خرفه از طریق افزایش مصرف انرژی و کاهش بیان آنزیم‌های محدودکننده سرعت سنتز اسیدچرب در کبد باعث مهار پراکسیداسیون لیپید می‌شود. از سوی دیگر، خرفه حاوی مقادیر زیادی الکالوئیدهای فنولیک است که این الکالوئیدها نیز از طریق افزایش اسید چرب غیراشباع باعث مهار سنتز کلسترول می‌شوند (۱۹). در تحقیق صالحی و همکاران مصرف ۸ هفته عصاره خرفه و تمرینات مقاومتی کاهش معناداری را در سطوح شاخص‌های مرتبط با آسیب کبدی نشان داد (۲۰).

لذا در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا تأثیر تمرینات تناوبی شدید (HITT[1]) را همراه با مصرف عصاره خرفه بر بیماری کبد چرب غیرالکلی به دلیل کمبود اطلاعات کافی در زمینه ارتباط این عوامل با فاکتور P (SeP) و گلوکز و مقاومت به انسولین را مورد مطالعه قرار دهیم.

روش تحقیق

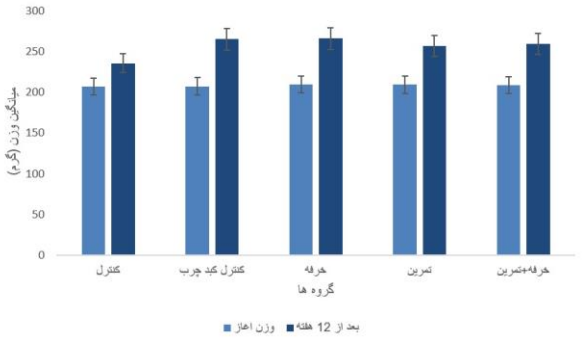
آزمودنی‌ها

مطالعه حاضر از نوع تحقیقات تجربی بود. برای این منظور تعداد ۲۵ سر موش صحرایی با نژاد ویستار، سن ۶ هفته و دامنه وزنی ۱۸۵-۱۶۰ گرم از آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی بجنورد تهیه شدند. حیوانات پس از انتقال به محیط تحقیق و آشنایی با محیط جدید و فعالیت نوار گردان، ابتدا بر اساس وزن گروه‌بندی شده و قفسه‌ها به صورت تصادفی نام‌گذاری شدند. سپس به ۵ گروه ۵ تایی شامل (۱- سالم، ۲- کنترل کبد چرب، ۳- تمرین ، ۴- خرفه، ۵- تمرین+ خرفه) تقسیم شدند. برای القای مدل کبد چرب، موش‌ها گروه کنترل کبد چرب، تمرین، خرفه، تمرین + خرفه، به مدت ۱۲ هفته تحت رژیم غذایی پر چرب قرار گرفتند و موش های گروه سالم ۱۲ هفته رژیم غذای استاندارد دریافت کردند. رژیم غذایی پر چرب شامل پلت‌های دست‌ساز با این مشخصات بود: یک کیلو پلت پر چرب شامل ۳۵۰ گرم پلت استاندارد (۳۵ درصد) ،۳۹۶ گرم روغن دنبه (۳۹/۶ درصد)، ۲۰۰ گرم پودر پروتئین وی (۲۰ درصد که شامل ۷۵ درصد پروتئین، ۱۲ درصد کربوهیدرات، ۸ درصد چربی و ۵ درصد ویتامین و مواد معدنی) ۵۰ گرم فروکتوز (۵ درصد) ۴ گرم کلسترول (یک درصد کولین کلراید و ۰/۴ درصد کلسترول مرک آلمان). برای اطمینان از ابتلا به کبد چرب، سطح آنزیم‌های کبدی موش‌ها مورد سنجش قرار گرفت و افزایش آنزیم‌ها به عنوان معیار ورود به تحقیق در نظر گرفته شد (۲۱).

نمودار ۱ میانگین وزن موش‌ها بر حسب گرم قبل و بعد ۱۲ هفته رژیم پر چرب را نشان می‌دهد.

[1] High-intensity interval training

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]



نمودار ۱- میانگین وزن موش‌های صحرایی(گرم) پیش آزمون قبل و بعد از القای کبد چرب غیرالکلی

پروتکل تمرینات تناوبی شدید HIIT

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌کنید، آزمودنی‌های گروه تمرین به اجرای ۸ هفته تمرینات تناوبی شدید HIIT پرداختند. موش‌ها پس از سازگاری با محیط جدید، جهت آشنایی با نوار گردان، ابتدا به مدت یک هفته (۵ جلسه)، ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه با سرعت ۱۰-۶ متر بر دقیقه با شیب صفر بر روی نوار گردان دویدند.

سپس به منظور تعیین دقیق شدت تمرین، آزمون حداکثر سرعت دویدن با استفاده از نوار گردان به روش غیر مستقیم انجام شد. بر این اساس بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت پایین، آزمون دویدن موش‌های صحرایی شروع و سرعت نوار گردان هر ۲ دقیقه یک‌بار به میزان ۰/۰۳ متر بر ثانیه (۱/۸ تا ۲ متر بر دقیقه) افزایش یافت، تا جایی که حیوان دیگر قادر به دویدن نباشد. سرعتی که در آن VO_{2max} به‌دست می‌آید به عنوان سرعت ماکزیمم تعریف شد. پژوهش صورت گرفته نشان می‌دهد ارتباط مستقیمی بین سرعت نوار گردان و VO_{2max} موش‌های نر وجود دارد ($P<0/05$ ، ۰/۹۸- =۰/۹۴)(۲۲, ۲۳)(r). از این رو می‌توان با توجه به سرعت دویدن، میزان VO_{2max} موش‌ها را برآورد کرد (۲۴). بعد از ۲ روز استراحت پس از مرحله آشنایی و اندازه‌گیری VO_{2max} برنامه ورزشی طراحی شد.

جزئیات برنامه تمرین تناوبی شدید در جدول یک نشان داده شده است.

جدول ۱- جزئیات پروتکل تمرین

هفته تمرین	تناوب شدید		استراحت بین ست‌ها	
	تعداد ست (یک دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)	تعداد ست (یک دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)
اول	۷	۳۰	۶	۱۵
دوم	۸	۳۰	۷	۱۵
سوم	۸	۳۴	۷	۱۷
چهارم	۹	۳۸	۸	۱۹
پنجم	۹	۴۲	۸	۲۱
ششم	۹	۴۶	۸	۲۳
هفتم	۹	۵۰	۸	۲۳
هشتم	۹	۵۴	۸	۲۵

عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه

گیاه خرفه از مناطق رویش آن در خراسان رضوی در فصل تابستان جمع‌آوری و پس از تأیید کارشناس گیاه‌شناسی و شستشو با آب و خشک شدن آسیاب شد. پودر به‌دست آمده با اتانول آبی ۸۰ درصد استخراج شد و با تعیین محتوای اسید لینولئیک، عصاره‌ها طبق روشی که قبلاً انجام شده بود، استاندارد شد (۲۵). بعد از تأیید در آزمایشگاه کنترل کیفی با کد هرباریوم ۱۵۱/۰۰۱/۰۰۱ بر اساس وزن موش های صحرایی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

وزن رت‌ها به صورت گاواژ برای مدت هشت هفته به گروه خرفه و تمرین+خرفه خورانده شد (۲۶).

کشتار، نمونه‌برداری بافت و تهیه سرم

به منظور اجتناب از تفسیر اشتباه داده‌ها به دلیل آثار باقیمانده از تمرینات ورزشی، موشهای صحرایی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از ناشتایی شبانه بی‌هوش شدند. بی‌هوشی با استفاده از تزریق درون صفاقی ترکیبی از داروی کتامین (۶۰ تا ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (هشت میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) انجام گرفت. بعد از آن شکم حیوان شکافته و در کمتر از یک دقیقه بافت کبد جدا و با محلول طبیعی سالین به خوبی شست وشو داده شد تا خون اضافی روی بافت پاک شود. سپس به منظور تهیه سرم مورد نیازجهت اندازه‌گیری میزان قند و انسولین نمونه‌های خونی بلافاصله بعد از شکافتن قفسه سینه، به صورت مستقیم با سرنگ پنج سی‌سی دارای سر سوزن۲۴، خون‌گیری از بطن چپ قلب انجام شده و نمونه خون به آرامی در جدار داخلی لوله آزمایش تخلیه شد. قبل از سانتریفیوژ جهت جداسازی سرم، نمونه در لوله آزمایش در دمای اتاق (۲۲ تا ۲۵درجه سانتی‌گراد) به مدت۳۰ دقیقه برای لخته شدن نگهداری شد. سپس لوله‌های آزمایش در چاهک‌های دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شده و دستگاه روی سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت۱۰ دقیقه جهت جداسازی سرم تنظیم شد. پس از سانتریفیوژ، سرم توسط سمپلر به میکروتیوپ۲ منتقل و در فریزر۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

گلوکز

سطح گلوکز خون ناشتا با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون (تهران-ایران) به روش فتومتریک اندازه‌گیری شد.

انسولین

سطح انسولین پلاسما به روش الایزا و با کیت شرکت Creative Diagnostics امریکا با شماره کاتالوگ DEIA1897 اندازه‌گیری شد.

سلنوپروتئین P (SeP)

سطح SeP کبدی به روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. برای این منظور در مرحله آشکارسازی، از دقیق‌ترین و حساس‌ترین تکنیک‌های آشکارسازی باند پروتئینی مورد نظر (که با آنتی‌بادی اولیه اختصاصی خود شناسایی شده است) که استفاده از کیت‌های Chemoluminescnce می‌باشد استفاده شد. کیت ECL advanced reagents که در این مطالعه استفاده شد شامل non-fat milk و Reagents A,B است و برای آشکارسازی Reagents A,B با نسبت ۱:۱ مخلوط شده و حجم نهایی محلول مذکور برای هر سانتی‌متر مکعب از کاغذ ۰/۱ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

مقاومت به انسولین

برای محاسبه مقاومت به انسولین از مدل ارزیابی مقاومت به انسولین هومئوستازیس (HOMA-IR) طبق فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{HOMA-IR}=\frac{FBS\times FI}{22.5}$$

که در آن FBS قند خون ناشتا (میلی‌مول بر لیتر)، FI انسولین پلاسما ناشتا (میکرو واحد بر لیتر) می‌باشد. در این روش یک فرد با حساسیت طبیعی به انسولین برابر ۱ می‌شود و در ارزیابی‌های آزمایشگاهی تا میزان HOMA برابر با ۲/۵، طبیعی در نظر گرفته می‌شود (۲۷).

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از جمع‌آوری و وارد کردن داده‌ها در محیط نرم افزار SPSS نسخهٔ ۲۴ و تعیین برچسب‌هایی برای متغیرها، با استفاده از این نرم‌افزار داده‌های خام مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت؛ به طوری‌که برای محاسبه شاخص‌های گرایش مرکزی، پراکندگی و رسم نمودارها از آمار توصیفی استفاده شد. برای اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و جهت اطمینان از همسان بودن واریانس‌های بین گروهی از آزمون لِوین استفاده شد. برای

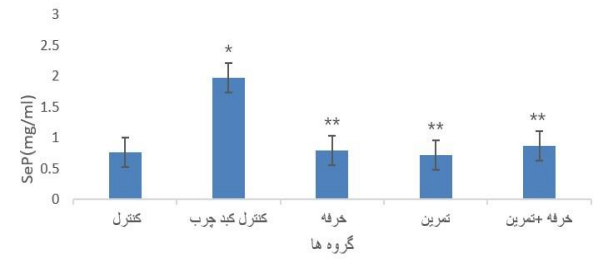
[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آمار استنباطی آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه تفاوت‌های بین گروهی از آزمون‌های تعقیبی توکی استفاده شد. به‌منظور رد یا تأیید فرضیه‌ها، سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقایسه سطوح SeP در گروه‌های تحت مطالعه

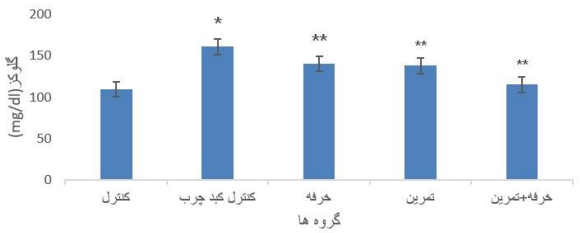
نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین سطح SeP گروه‌های تحقیق پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره خرفه تفاوت معناداری وجود دارد (P=۰/۰۰۱). نتایج آزمون توکی همچنین نشان داد بین سطح SeP پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره خرفه، بین گروه کنترل و کنترل کبد چرب به طور معنادار اختلاف وجود دارد. (P<۰/۰۵) و در گروه کنترل کبد چرب سطح این هپاتوکین بالاتر می‌باشد. همچنین بین سطح این فاکتور در گروه تمرین (P=۰/۰۰۱)، خرفه (P=۰/۰۰۱) و تمرین+خرفه (P=۰/۰۰۱) با گروه کنترل کبد چرب اختلاف معنا دار است و در این گروه ها سطح سلنوپروتئین P پایینتر است. به علاوه بین گروه تمرین، خرفه و تمرین+خرفه تفاوت معنادار مشاهده نشد (P<۰/۰۵). نمودار ۲ مقایسه سطح SeP گروه‌های تحقیق پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره خرفه را نشان می‌دهد.



نمودار۲- سطح میانگین سلنوپروتئین P (µg/ml) گروه‌های تحقیق و مقایسه بین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی. * P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل، ** P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه کبد چرب کنترل

مقایسه سطوح گلوکز خون ناشتا در گروه‌های تحت مطالعه

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد بین سطح گلوکز خون ناشتای گروه تحقیق پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره خرفه تفاوت معناداری وجود دارد. (P=۰/۰۰۱) نتایج آزمون توکی همچنین نشان داد سطح گلوکز خون ناشتا در گروه کنترل کبد چرب نسبت به گروه تمرین (P=۰/۰۱)، خرفه (P=۰/۰۰۲) و تمرین+خرفه (P=۰/۰۰۱) به‌طور معناداری بالاتر بود. سطح این فاکتور در گروه‌های تمرین، خرفه و تمرین+ خرفه معنادار نبود (P>۰/۰۵). نمودار ۳ مقایسه سطح گلوکز گروه های تحقیق پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره خرفه را نشان می‌دهد.

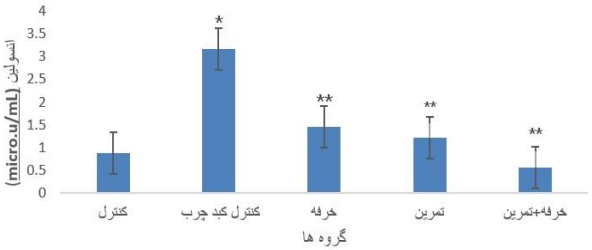


نمودار۳- سطح میانگین گلوکز (mg/Dl) گروه‌های تحقیق و مقایسه بین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی. * P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل، ** P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه کبد چرب کنترل

مقایسه سطوح انسولین در گروه‌های تحت مطالعه

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین سطح انسولین پلاسما گروه‌های تحقیق پس از ۸ هفته تمرین و مصرف عصاره خرفه، تفاوت معناداری وجود دارد (P=۰/۰۰۱). نتایج آزمون توکی همچنین نشان داد که سطح انسولین در گروه کبد چرب کنترل نسبت به گروه تمرین (P=۰/۰۰۵)، خرفه (P=۰/۰۱۱) و تمرین+خرفه (P=۰/۰۰۲) به‌طور معناداری بالاتر بود. سطح انسولین پلاسما در گروه‌های خرفه، تمرین و تمرین+خرفه تفاوت معنادارنداشت. (P>۰/۰۵). نمودار ۴ مقایسه سطح انسولین گروه های تحقیق پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره خرفه را نشان می‌دهد.

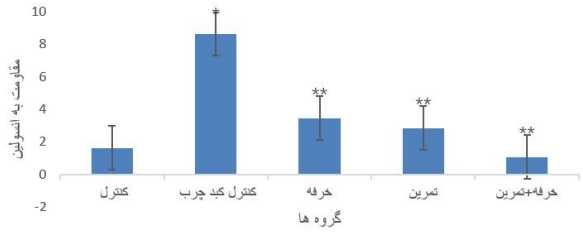
[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]



نمودار٤- سطح میانگین انسولین micro.u/L گروه‌های تحقیق و مقایسه بین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی. * P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل، ** P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه کبد چرب کنترل

مقایسه مقاومت به انسولین در گروه‌های تحت مطالعه

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که بین سطح مقاومت به انسولین پلاسما گروه‌های تحقیق پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره خرفه، تفاوت معناداری وجود دارد (P=۰/۰۰۲). نتایج آزمون توکی نشان داد که سطح مقاومت به انسولین در گروه کنترل کبد چرب نسبت به گروه تمرین (P=۰/۰۱۲)، خرفه (P=۰/۰۳۷) و تمرین+خرفه (P=۰/۰۱) به‌طور معناداری بالاتر بود. سطح مقاومت به انسولین در گروه‌های خرفه، تمرین و تمرین+ خرفه تفاوت معنادارمشاهده نشد (P>۰/۰۵). نمودار ۵ مقایسه سطح مقاومت به انسولین را در گروه‌های تحقیق پس از ۸ هفته تمرین و مصرف عصاره خرفه نشان می‌دهد.



نمودار٥- میزان میانگین مقاومت به انسولین (HOMA-IR) در گروه‌های تحقیق و مقایسه بین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی بررسی شد. * P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل، ** P<۰/۰۵ اختلاف معنادار با گروه کبد چرب کنترل

بحث

از جمله فواید تمرینات تناوبی شدید HIIT افزایش حساسیت به انسولین به دلیل آمادگی بیشتر عضلات برای مصرف گلوکز می‌باشد (۲۸). به نظر می‌رسد SeP با سرکوب گونه‌های فعال اکسیژن (Ros)، پروتئین کیناز وابسته به آدنوزین مونوفسفات (AMPK) در عضله اسکلتی از طریق گیرنده پروتئین مرتبط با گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم پروتئین ۱ (LRP1) تأثیرات بهبود سلامت تمرینات ورزشی را مختل می‌کند. (۲۹) بنابراین تمرینات تناوبی شدید با تأثیر بر سطح انسولین و گلوکز و با افزایش فعالیت AMPK منجر به پایین آمدن سطح SeP در کبد بیماران کبد چرب غیر الکلی می‌شود. تمرینات تناوبی شدید به‌طور قابل توجهی سطوح بتا هیدروکسی آسیل کوآ دهیدروژناز[1] میتوکندری عضلانی را افزایش می‌دهد که ممکن است باعث افزایش چربی‌سوزی شود. علاوه بر این، سنتز مجدد گلیکوژن در طول و بعد از تمرینات HIIT اتفاق می‌افتد و نیاز به حذف لاکتات و یون هیدروژن اکسیداسیون چربی را افزایش می‌دهد. در نتیجه، HIIT و سایر روش‌های تمرینی نشان‌دهنده مداخله مهمی برای کاهش وزن و به دنبال آن بهبود شرایط بیماری کبد چرب هستند، زیرا پتانسیل کاهش توده بدن، افزایش توده بدون چربی و حفظ یا افزایش سرعت متابولیسم در حالت استراحت را دارند (۱۷).

رونویسی SeP کبدی از طریق رونویسی فاکتورهای FOXO1 و HNF-4α همراه با فعال کننده PGC-1α تنظیم می‌شود و همچنین ممکن است تحت شرایط هایپرگلیسمی و مقاومت به انسولین دچار اختلال شود (۸). نتایج مطالعات همسو نیز نشان داد تمرینات ترکیبی منجر به کاهش سطح سرمی SeP و سایر فاکتورهای التهابی مربوط به مقاومت به انسولین در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی شد (۳۰).

شواهد نشان می‌دهد که تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک از جمله بیماری‌ها مثل کبد چرب سیستم ضد اکسایش اندوژن (آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) تضعیف می‌شوند، در چنین مواقعی نقش مواد آنتی‌اکسیدانی اگزوژن (از قبیل ویتامین E،

[1] Beta oxidation Acyl-coA dehydrogenase

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

ویتامین C، امگا ۳ و...) که از طرق رژیم غذایی به ویژه مکمل‌های گیاهی باید تأمین شود، اهمیت پیدا می کند. خرفه سرشار از پروتئین، کربوهیدرات، کلسیم، پتاسیم، سدیم، روی، فلاونویید، امگا ۳ و ترکیب‌های زیستی همانند دوپامین و نورآدرنالین است. همچنین این گیاه دارای مقادیر زیادی آلفالینولئیک اسید، بتاکاروتن، فلاونوئید، کومارین‌ها، گلیکوزیدهای مونوترپنی و آلکالوئید می‌باشد. امگا ۳ یا لینولنیک اسید یک اسید چرب ضروری است که بدن قادر به سنتز آن نمی‌باشد (۱۹). از اسید های چرب امگا۳، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA[1]) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA[2]) می‌باشند که به وفور در خرفه یافت می‌شوند که در پی مصرف آن کاهش قابل توجهی در تری‌گلیسرید خون گزارش شده است که به نوبه خود می‌تواند در روند بهبود بیماری NAFLD مؤثر باشد (۶). عصاره خرفه نقش مهمی در کاهش کلسترول خون دارد که احتمالاً به دلیل وجود مواد آنتی‌اکسیدانی، الکالوئیدها، فیبر، کوانزیم Q10 و مقادیر فراوان امگا ۳ موجود در آن و مکانیسم‌های مهار سنتز کلسترول است. به نظر می‌رسد مکانیسم کاهش سطح SeP در اثر مصرف این گیاه احتمالاً بر اثر وجود ترکیبات ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) آن و تأثیر بر بیان SeP و اثر اسیدهای چرب امگا۳، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) بر کاهش اسیدهای چرب و به دنبال آن افزایش حساسیت به انسولین در کبد می‌باشد. مطالعات نشان داد که مصرف کپسول خرفه نیم گرم در روز به مدت هشت هفته در دختران چاق و دارای اضافه وزن منجر به کاهش گلوکز خون و بهبود پروفایل لیپیدی شد (۱۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به آنچه بیان شد بیماری کبد چرب غیرالکلی در اثر تغییر سبک زندگی و تغذیه به وجود می‌آید. به نظر می‌رسد اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، لیپید و تنظیم ترشح هپاتوکین‌ها و ایجاد مقاومت به انسولین از عوامل بروز این بیماری می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد تمرینات تناوبی با شدت بالا به تنهایی و همراه مصرف عصاره خرفه تأثیر مثبتی بر میزان سلنوپروتئین پی و مقاومت به انسولین در موش‌های دارای کبد چرب دارد. این تمرینات به تنهایی و همراه با مصرف عصاره خرفه می‌تواند در جهت کاهش عوارض بیماری کمک کننده باشند.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان، در مقطع کارشناسی‌ارشد در سال ۱۴۰۱ با کد ۱۸۲۰۲۹۰۰۶۵۱۹۰۴۷۱۴۶۰۱۷۱۶۲۶۱۹۹۵۳ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی بجنورد اجرا شده است. از کلیه عزیزانی که در مراحل مختلف این مقاله ما را یاری نمودن، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بجنورد با کد IR.IAU.BOJNOURD.REC.1401.003 انجام شد.

حمایت مالی

کلیه هزینه‌های اجرای پایان‌نامه به صورت شخصی تأمین شده است.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول و مسئول نقش یکسانی در مقاله داشته‌اند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[1] Eicosapentaenoic Acid
[2] Docosahexaenoic Acid

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

منابع:

1- Davoodi M, Moosavi H, Nikbakht M. The effect of eight weeks selected aerobic exercise on liver parenchyma and liver enzymes (AST, ALT) of fat liver patients. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012; 14(1): 84-90. [Persian] URL: http://78.39.35.44/article-1-1054-en.html

2- Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. Atherosclerosis. 2015; 239(1): 192-202. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.001

3- Ahvazi M, Khalighi-Sigaroodi F, Charkhchiyan MM, Mojab F, Mozaffarian V-A, Zakeri H. Introduction of medicinal plants species with the most traditional usage in Alamut region. I Iran J Pharm Res. 2012; 11(1): 185-94. PMCID: PMC3813099 PMID: 24250441

4- Kwon SY. [Prevalence and clinical significance of diabetes mellitus in patients with liver cirrhosis]. Taehan Kan Hakhoe Chi. 2003; 9(3): 205-11. PMID: 14515038 URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14515038/

5- Choi HY, Hwang SY ,Lee CH, Hong HC, Yang SJ, Yoo HJ, et al. Increased selenoprotein p levels in subjects with visceral obesity and nonalcoholic Fatty liver disease. Diabetes Metab J. 2013; 37(1): 63-71. DOI: 10.4093/dmj.2013.37.1.63.

6- Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, et al. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. Cell Metab. 2010; 12(5): 483-95. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.09.015

7- Misu H, Takayama H, Saito Y, Mita Y, Kikuchi A, Ishii KA, et al. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. Nat Med. 2017; 23(4): 508-16. DOI: 10.1038/nm.4295

8- Jackson MI, Cao J, Zeng H, Uthus E, Combs GF. S-adenosylmethionine-dependent protein methylation is required for expression of selenoprotein P and gluconeogenic enzymes in HepG2 human hepatocytes. J Biol Chem. 2012; 287(43): 36455-64. PMCID: PMC3476311 DOI: 10.1074/jbc.M112.412932

9- Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. J Hepatol. 2012; 57(1): 157-66. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.023

10- Paluch A, Church T, Blair S. Effect of an Intensive Exercise Intervention Strategy on Modifiable Cardiovascular Risk Factors in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. Current Cardiovascular Risk Reports. 2011; 5. https://link.springer.com/article/10.1007/s12170-011-0203-3

11- Takamura T. Hepatokine selenoprotein P-mediated reductive stress causes resistance to intracellular signal transduction. Antioxid Redox Signal. 2020; 33(7): 517-24. PMCID: PMC7409583 DOI: 10.1089/ars.2020.8087

12- Cardaci S, Filomeni G, Ciriolo MR. Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. J Cell Sci. 2012; 125(9): 2115-25. DOI: 10.1242/jcs.095216

13- Kang C, O'Moore KM, Dickman JR, Ji LL. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α signaling is redox sensitive. Free Radic Biol Med. 2009; 47(10): 1394-400. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.007

14- Whitsett M, VanWagner LB. Physical activity as a treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. World J Hepatol. 2015; 7(16): 2041-52. DOI: 10.4254/wjh.v7.i16.2041

15- Talanian JL, Galloway SDR, Heigenhauser GJF, Bonen A, Spriet LL. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. J Appl Physiol (1985). 2007; 102(4): 1439-47. DOI: 10.1152/japplphysiol.01098.2006

16- Sadeghi S, Asad MR, Ferdowsi MH. The effect of twelve weeks endurance training on liver enzymes levels in Iranian obese women. Research in Sport Medicine and Technology. 2017; 15(13): 49-60. [Persian] URL: http://jsmt.khu.ac.ir/article-1-213-en.html

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]

17- Ghorbanian B, Egtesadi S. The effect of high intensity interval training (HIIT) on serum levels of selenoprotein P and glycemic and body composition indices in women with nonalcoholic fatty liver disease. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. 2022; 9(1): 12-21. [Persian] DOI: 10.22049/JAHSSP.2021.27318.1367

18- Ghorbanian B, Saberi Y, Azali Alamdari K, Shokrollahi F, Mohammadi H. The Effects of Portulaca Supplementation on Antioxidant Biomarkers and Oxidative Stress in non-Active Girls. J Med Plants. 2019; 18(72): 255-63. [Persian] URL: http://jmp.ir/article-1-2720-en.html

19- Radhakrishnan R, Zakaria MN, Islam MW, Chen HB, Kamil M, Chan K, et al. Neuropharmacological actions of Portulaca oleraceae L v. sativa (Hawk). J Ethnopharmacol. 2001; 76(2): 171-6. URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874101002306.

20- Salehi A, Farzanegi P. EFFECT OF 8 WEEKS OF RESISTANCE TRAINING WITH AND WITHOUT PORTULACALO SEEDS ON SOME OF LIVER INJURY MARKERS IN WOMEN WITH DIABETES TYPE 2. Studies in Medical Sciences. 2015; 25(11): 968-78. [Persian] URL: http://umj.umsu.ac.ir/article-1-2603-en.html

21- Barjasteyazdy A, Zarei M. The effect of high intensity interval training (HIIT) with portulaca Oleracea supplementation on serum levels of liver enzyme in rats with non-alcoholic fatty live disease. Journal of Sport and Biomotor Sciences. 2021; 26(26): 56-65. [Persian] URL: http://jahssp.azaruniv.ac.ir/article_14486.html?lang=en

22- Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High-and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesit. Diabetes. 2013; 62(7): 2287-9. URL: https://diabetesjournals.org/diabetes/article/62/7/2287/33803/High-and-Moderate-Intensity-Training-Normalizes

23- Hafstad AD, Boardman NT, Lund J, Hagve M, Khalid AM, Wisløff U, et al. High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. Journal of Applied Physiology. 2011; 111(5): 1235-1241. URL: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/japplphysiol.00594.2011

24- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. European Journal of Preventive Cardiology. 2007; 14(6): 753-60. URL: https://academic.oup.com/eurjpc/article/14/6/753/5933658

25- Darvish Damavandi R, Shidfar F, Najafi M, Janani L, Masoodi M, Akbari Fakhrabadi M, et al. Effect of Portulaca Oleracea (purslane) extract on liver enzymes, lipid profile, and glycemic status in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, double blind clinical trial. Phytotherapy Research. 2021; 35(6): 3145-56. [Persian] URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.6972

26- Zarei M, Kadkhoda Z, Yaghoubi A. Effect of High-Intensity Interval Training with Portulaca oleracea Supplementation on Liver LXα and PPARγ Receptors in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2022; 24(3): 178-87. [Persian] URL: http://ijem.sbmu.ac.ir/article-1-3042-en.html

27- Wilcox G. Insulin and insulin resistance. Clin Biochem Rev. 2005; 26(2): 19-39. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/

28- Bacchi E, Negri C, Targher G, Faccioli N, Lanza M, Zoppini G, et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). Hepatology. 2013; 58(4): 1287-95. URL: https://doi.org/10.1002/hep.26393

29- Misu H. Identification of hepatokines involved in pathology of type 2 diabetes and obesity. Endocr J. 2019; 66(8): 659-662. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/66/8/66_EJ19-0255/_article/-char/ja/

30- Iwanaga S, Hashida R, Takano Y, Bekki M, Nakano D, Omoto M, et al. Hybrid Training System Improves Insulin Resistance in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Pilot Study. Tohoku J Exp Med. 2020; 252(1): 23-32. URL https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/252/1/252_23/_article/-char/ja/

[DOI: 10.61186/JBUMS.30.3.257]