پژوهش‌نامهٔ فیزیولوژی ورزشی کاربردی **مقاله پژوهشی**
سال هجدهم/ شماره سی و پنجم/بهار و تابستان ۱۴۰۱

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱ ص ص: ۶۱-۴۵

تاثیر تمرین استقامتی بر متابولیسم لیپیدها در کبد موش‌های پیش‌دیابت

سمانه شیرخانی [۱]، سید محمد مرندی* [۱]، میلاد عبداللهی[۱]، فاطمه جانقربان [۱]، زهرا قوی[۱]، زهرا صفائی نژاد[۲]،
محمدحسین نصر اصفهانی*[۲]

چکیده

اهداف: پیش‌دیابت عامل خطر در دیابت است و در نتیجه سبک زندگی سالم برای جلوگیری از پیش‌دیابت مهم است. این مطالعه با هدف تعیین اثر تمرین استقامتی بر متابولیسم لیپیدهای کبدی در موش‌های نر C57BL/6 پیش دیابتی انجام شد.

روش مطالعه: ۲۱ موش به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه به مدت ۱۲ هفته با رژیم غذایی معمولی (ND , n=۷)، و دیگری رژیم غذایی پرچرب (HFD , n=۱۴) شدند. پس از ۱۲ هفته نگهداری اولیه موش‌های HFD آزمون تحمل گلوکز انجام دادند و بعد از ابتلا به پیش‌دیابت به دو گروه تمرین (EX)، و پیش‌دیابت (preD) تقسیم شدند. گروه تمرینی به مدت ۴۵ دقیقه روزانه، ۵ روز در هفته به مدت ۱۰ هفته تمرین استقامتی با تردمیل انجام دادند. ۲۴ ساعت پیش از قربانی نمودن نمونه‌ها وزن‌گیری و آزمون مجدد تحمل گلوکز برای ثبت وخامت یا میزان بهبود انجام و پس از آن پلاسما و کبد آزمودنی‌ها جمع‌آوری شد.. از مقادیر استیل کوآکربوکسیلاز بتا (ACC2)، کارنیتین پالمیتول ترانسفراز یک (CPT1) و گیرنده پروکسی‌زوم آلفا برای ارزیابی بتا اکسیداسیون استفاده شد. تفسیر داده‌ها ابا استفده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه با سطح معناداری $p<0.05$ انجام شد.

یافته‌ها: در گروه پیش‌دیابت وزن ، گلوکز، انسولین، مقاومت انسولینی و پروفایل لیپیدی افزایش معناداری به نسبت گروه نرمال تجربه کرد. در گروه EX فاکتورهای مذکور با کاهش معنادار همراه بود ($p<0.01$). غلظت پروتئین CPT1، به عنوان فاکتور کلیدی بتااکسیداسیون، در گروه preD کاهش یافت و ACC2 که مهار کننده آن می‌باشد افزایش داشت. تمرین استقامتی با معکوس کردن روند بیان این فاکتورها بهبود متابولیسم اسیدهای چرب را در کبد به دنبال داشت.

نتیجه گیری: به طور کلی preD تغییرات نامطلوب مرتبط با β اکسیداسیون را در کبد ایجاد کرد. درحالی که به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی این تغییرات را بهبود بخشید. این یافته‌ها نشان می دهد که احتمالا ورزش منظم یک رویکرد غیردارویی موثر برای پیش‌دیابت است.

واژه‌های کلیدی: پیش دیابت، کبد، لیپوژنز ، بتا اکسیداسیون، تمرین ورزشی.

[۱] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] گروه زیست فناوری سلولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان
* نویسندگان مسئول:
دکتر سید محمد مرندی s.m.marandi@spr.ui.ac.ir
دکتر محمد حسین نصر اصفهانی mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

مقدمه

پیش‌دیابت به سطحی بین گلوکز نرمال و گلوکز خون دیابت گفته می‌شود. تخمین زده شده است که نیمی از افراد با قند خون بالا در وضعیت پیش‌دیابت به سر می‌برند که اگر این شرایط به درستی مدیریت نشود، بالغ بر ۱۰ درصد این افراد به دیابت نوع۲ مبتلا خواهند شد (۱). دیابت نوع۲ تعاملی بین ژنتیک و ریسک فاکتورهای محیطی است که منجر به عدم عملکرد صحیح سلول‌های کبدی می‌شوند. چربی نابه‌جا واژه‌ای برای توصیف تجمع چربی در بافت‌هایی غیر از بافت چربی است. تجمع نابه‌جای چربی در بافت کبد رابطه نزدیکی با ایجاد، تشدید و وخامت دیابت دارد. افراد با دیابت نوع۲ میزان تجمع چربی نابه‌جا را افزایش داده‌اند و در نتیجه کاهش تجمع چربی در کبد به عنوان هدف اصلی برای کنترل بیماری‌های متابولیک توصیه شده است (۲).

الزاما کاهش وزن نشان دهنده‌ی بهبود متابولیسم کبد نیست و مطالعات نشان داده است ممکن است حتی بدون تغییر در وزن افراد وضعیت کبد بهبود یابد (۳). مطالعات گذشته تا حدودی روشن کرده‌اند که تمرینات ورزشی تجمع چربی را در کبد کاهش می‌دهد. بنابراین تغییر در مسیر سیگنالینگ آنزیم‌های مربوط به مصرف لیپیدها می‌تواند نقش مهمی در تغییرات فیزیولوژیکی مربوط به متابولیسم داشته باشد (۴). تجمع چربی در کاهش حساسیت گیرنده انسولین به آن و شکل‌گیری مقاومت انسولین موثر است و ورزش می‌تواند آن را کاهش دهد (۵). تمرینات استقامتی می‌تواند با تنظیم بتااکسیداسیون قطرات چربی موجود در کبد را کاهش دهد (۶). در مطالعات گذشته افراد مبتلا به پیش‌دیابت با تمرین توانسته‌اند تجمع لیپیدها را در کبد کاهش دهند و حساسیت انسولینی را بهبود ببخشند (۷). به علاوه در برخی مطالعات دیگر تمرینات استقامتی از طریق افزایش برداشت لیپیدها میزان دردسترس آن را برای برداشت کبد را کاهش می‌دهند، همچنین خروج آن‌ها را از کبد را بالا می‌برند و به عنوان منبع انرژی به عضلات تحویل می‌دهند (۸). مطالعات بیشتری در جهت درک این تغییرات فیزیولوژیک و اثر آن بر فاکتورهای مختلف باید صورت بگیرد. درحال حاضر نشان داده شده است تمرینات هوازی احتمالا در بهبود پیش دیابت و سوخت و ساز لیپیدها موثر هستند (۹).

اسیدهای چرب به عنوان لیگاند خارجی برای گیرنده آلفا فعال شده با پراکسی زوم (PPARα[1]) عمل می‌کند که بتااکسیداسیون اسیدهای چرب را در کبد بالا می‌برد. درواقع PPARα تنظیم کننده اصلی بتااکسیداسیون در میتوکندری و پروکسی‌زوم است (۱۰) و PPARα قادر است تا تجمع چربی‌ها را از طریق افزایش مصرف آن‌ها کاهش دهد (۱۱). کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز یک (CPT1[2]) آنزیم کلیدی در تنظیم بتااکسیداسیون اسیدهای چرب زنجیره بلند در میتوکندری است. مهار این آنزیم منجر به تجمع اسید چرب در کبد و درنتیجه پیدایش تری‌گلیسرید و به تبع آن شروع مقاومت انسولینی خواهد بود (۱۲). یکی از اصلی‌ترین مهارکننده‌های CPT1، مالونیل-کوآ است که توسط آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز (ACC2[3]) تولید می‌شود (۱۳). بنابراین مهار ACC2 منجر به افزایش CPT1 می‌شود، در نتیجه غلظت مالونیل‌کوآ کاهش می‌یابد و اکسیداسیون اسیدهای چرب بالا می‌رود (۱۴).

---

[1] Peroxisome Activated-Proliferator Receptor Alpha
[2] Carnitine palmitoyl transferase I
[3] Acetyl-CoA carboxylase II

با در نظر گرفتن آنچه گفته شد و اهمیت مسئله پیش‌دیابت و لزوم بررسی آن در سلامت کبد به عنوان یک عضو حیاتی در بدن، این پژوهش برای بررسی اثر تمرینات استقامتی در پاتوژنز پیش‌دیابت کبد طراحی شد و با هدف ارائه راه‌کار احتمالی برای جلوگیری از وخامت مقاومت انسولینی و شکل‌گیری سندروم متابولیک از طریق تمرین ورزشی به نگارش درآمده است.

روش‌شناسی تحقیق

حیوانات

۲۱موش نر C57BL/6 در سن چهار هفتگی با وزن تقریبی ۱۲ تا ۱۴ گرم از پژوهشگاه رویان اصفهان خریداری شدند. موش‌ها تحت شرایط استاندارد با چرخه نور تاریک ۱۲ ساعته (۷ صبح تا ۷ بعد از ظهر) در دمای کنترل شده (۱ ± ۲۳ درجه سانتیگراد) و رطوبت (۵۰-۶۰٪) قرار گرفتند. همه موش‌ها به طور آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. پروتکل مطالعه حیوانات با کد (IR. ACECR. ROYAN. REC. 1399.075) مورد تایید کمیته اخلاق پژوهشگاه زیست فناوری رویان بوده است.

رژیم غذایی

پس از یک هفته سازگاری موش‌ها به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند: رژیم غذایی معمولی (ND[1], n=۷) که شامل ۱۰٪ چربی، ۲۰٪ پروتئین، ۷۰٪ کربوهیدرات و رژیم غذایی پرچرب (HFD[2], n=۱۴) که شامل ۶۰٪ چربی، ۲۰٪ پروتئین، ۲۰٪ کربوهیدرات. این رژیم ها به مدت ۱۲ هفته به عنوان مرحله اول مطالعه اعمال شدند. پس از مرحله اول، موش‌های گروه HFD به طور تصادفی به دو گروه (n=۷) تقسیم شدند: ۱) پیش‌دیابت (preD)۲) تمرین استقامتی (EX). روند مطالعه در گروه‌ها به مدت ۱۰ هفته با رژیم غذایی مشابه مرحله اول دنبال شد.

نمونه برداری

آزمون تحمل گلوکز (GTT[3]) متداول‌ترین روش مورد استفاده برای ارزیابی هموستاز گلوکز در جوندگان است. اندازه گیری پایه قند خون (ناشتا) قبل از تزریق صفاقی گلوکز به شکل ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با حجم تزریق ۰/۱ میلی لیتر به ازای ۱۰ گرم وزن بدن صورت گرفت. سپس اندازه‌گیری‌های مکرر در فواصل ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه‌ای از تزریق به وسیله گلوکومتر مخصوص جوندگان بعمل آمد. وزن بدن (BW) به صورت هفتگی در طول دوره آزمایش ثبت شد. در پایان مرحله دوم، حیوانات یک شب (۱۲ ساعت) ناشتا بودند و سپس با تزریق داخل صفاقی کتامین ۱۰ درصد (50 mg/kg) و زایلازین ۲ درصد (10 mg/kg) بیهوش شدند. خون از بطن راست گرفته شد، در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد، در ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا پلاسما جدا سازی شود و سپس بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. بافت کبد بلافاصله جدا و پس از آن با جمع آوری چربی احشائی اطراف معده، روده و دور کلیه‌ها، بافت‌ها در ابتدا وزن کشی و سپس در ویال جمع آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد برای تجزیه و تحلیل بیشتر ذخیره شد.

پروتکل تمرینی

[1] Normal Diet
[2] High Fat Diet
[3] Glucose Tolerance Test

تمرین ورزشی روی تردمیل جوندگان (MazeRouter،ایران) با شدت متوسط (۱۵) به مدت ۱۰ هفته از مرحله دوم مطالعه انجام شد. به طور خلاصه، موش‌ها در دو هفته اول شروع به دویدن روی تردمیل با سرعت ۱۷ متر در دقیقه کردند. سپس سرعت دویدن به تدریج هر دو هفته یک بار افزایش یافت و در دو هفته پایانی دوره تمرینی به ۲۳ متر در دقیقه رسید. موش ها ۴۵ دقیقه در روز دویدند و هر هفته ۵ روز ورزش کردند. هر جلسه تمرینی شامل ۳ دقیقه گرم کردن، ۴۰ دقیقه دویدن و ۲ دقیقه ریکاوری بود.

تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی

آنالیز قند خون ناشتا (FBG[۱]) و تست تحمل گلوکز هر دو در پایان مرحله اول (هفته دوازدهم) و مرحله دوم (هفته بیست و سوم) با استفاده از گلوکومتر (گلوکومتر آلفا TRAK، Zoetisus، Parsippany) انجام شد. برای GTT، ۲۰۰ میکرولیتر محلول آب گلوکز با تزریق صفاقی به موش‌های ۶ ساعته ناشتا داده شد. سطح گلوکز خون در ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تغذیه اندازه‌گیری شد. سطوح انسولین پلاسما با استفاده از کیت الایزا انسولین فوق حساس موش (INSMS-E01, ALPCO, Salem, NH, USA-۸۰) و طبق دستورالعمل سازنده تعیین شد. سطوح پلاسما آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) به ترتیب با استفاده از کیت های الایزا (AST CSB-E12649m) و (ALT MBS016898) موش (Abcam، کمبریج، انگلستان) اندازه‌گیری شد. سطوح لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) و لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) با استفاده از کیت (Cat. K613-100, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) طبق پروتکل سازنده تعیین شد. تمام سنجش‌های الایزا با استفاده از (NS-100 Nano Scan Microplate Reader Hercuvan Lab Systems، کمبریج، انگلستان) انجام شد.

جداسازی RNA و تجزیه و تحلیل بیان ژن

RNA از نمونه‌های کبد منجمد با استفاده از دستورالعمل استفاده از محلول ترایزول استخراج شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop1000 ارزیابی شد. سنتز cDNA با کیت بایوتک ربیت (biotechrabbit GmbH) انجام گرفت. آزمون Real Time-PCR برای ژن 18s و Cpt1 و Ppara و Acc2 با دستگاه (Amplicon, Brighton,انگلستان) انجام شد و داده‌های آنها به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد سنجش قرار گرفت. در جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده با طول میانگین ۲۰ جفت باز نوشته شده است.

استخراج پروتئین و تجزیه و تحلیل وسترن بلات

پروتئین‌های موجود در بافت کبد با استفاده از دستورالعمل استفاده از محلول ترایزول استخراج شدند. غلظت پروتئین با استفاده از کیت سنجش پروتئین Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific) تعیین شد. مقادیر مساوی (۳۰ میکروگرم) از پروتئین کل از هر نمونه با الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید جدا شد و سپس به غشاهای پلی وینیلیدین فلوراید منتقل شد. پس از مسدود کردن غشاها با ۱۰ درصد شیر بدون چربی، آنها با آنتی بادی های اولیه به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق (۱ ± ۲۳ درجه سانتیگراد) انکوبه شدند. آنتی بادی های اولیه مورد استفاده به شرح زیر بودند: (sc-137104، 1:1000) ACC2، 1:1000)، (sc-398135، کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز۱ (1:1000) (CPT1) ، (sc-514555، و-β اکتین1:1000) سپس غشاها به

[۱] Fast Blood Glucose

مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با آنتی بادی های ثانویه زیر انکوبه شدند IgG :آنتی بادی ضد ایمونوگلوبین موشی و خرگوشی کونژوگه. شدت باند با استفاده از نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد.

جدول۱: پرایمرها

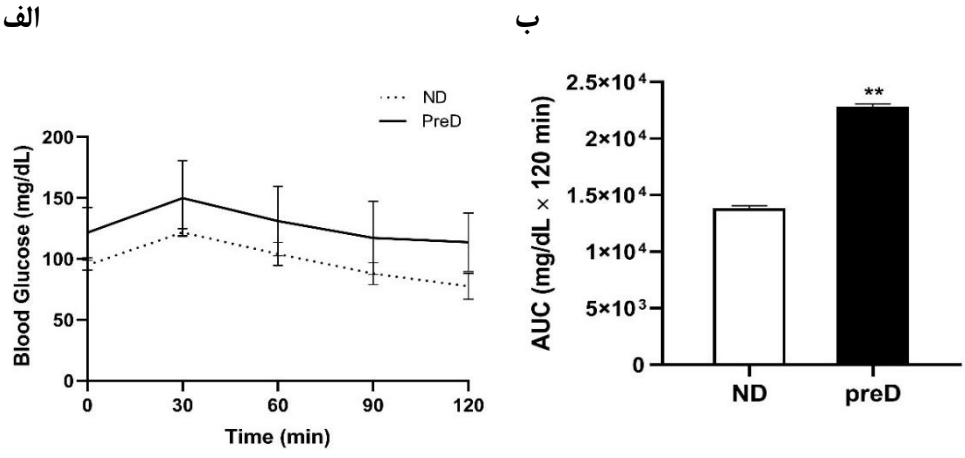
نام پرایمر	توالی پرایمر	
18S	F	AATTATTCCCCATGAACGAGG
	R	CACTAAACCATCCAATCGGTA
ACC2	F	CACCCCTCCCAGAACCTC
	R	TCTCCACTACCCCAACATCCC
CPT1	F	AGATACACCAACGGGCTCA
	R	TGTCAAGAAAGGCACTCTCAC
PPARα	F	AGGCCAAGTTGAAAGCAGAA
	R	GTCTTCTCTGCCATGCACAA

تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. داده‌ها در این مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه برای تعیین تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) انجام شد. سطح معنی داری $p < 0.05$ تعیین شد.

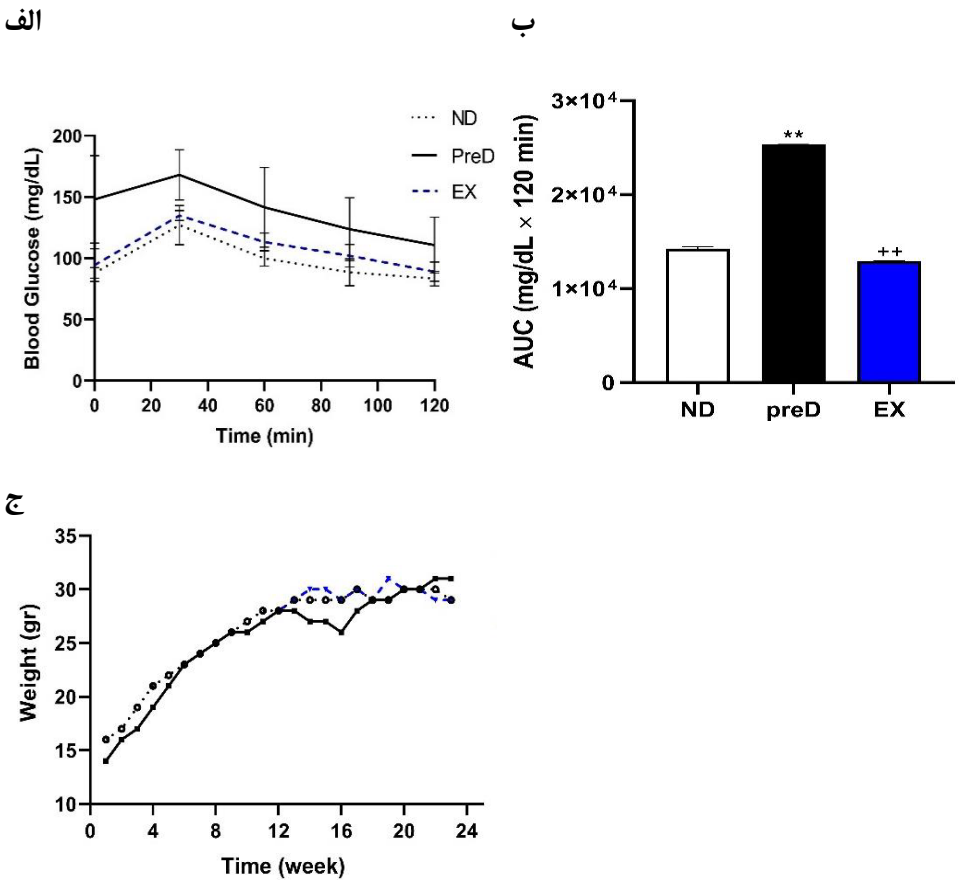
یافته‌ها

در انتهای ۱۲ هفته که انتهای فاز اول این مطالعه در نظر گرفته می‌شود، تست GTT از آزمودنی‌ها انجام شد. بر اساس نتایج این آزمون که در شکل ۱ نشان داده شده است، القای پیش‌دیابت در گروه مصرف کننده HFD با موفقیت روبرو بوده و اختلاف قند خون آزمودنی‌های گروه ND و preD به طور معناداری مشاهده می‌شود.



شکل۱- تست تحمل گلوکز در طول ۱۲ هفته اول مداخله. الف) روند تغییر قند خون پس از قند خون ناشتا و تزریق گلوکز . ب) سطح زیر منحنی نمودار الف. ** معناداری preD در مقابلND در سطح $p < 0.01$

شکل ۲-الف تست GTT گروه‌ها در انتهای هفته ۲۳ را نشان می‌دهد. بر اساس این نتایج (شکل۲-ب) بیشترین قند خون در انتهای مطالعه متعلق به گروه پیش دیابت است که اختلاف معناداری با سایر گروه‌ها نشان می‌دهد. بعلاوه مشاهده می‌شود که تمرینات ورزشی توانسته تا سطح قند خون را به حد نرمال کاهش دهد. در شکل۲-ج روند وزن‌گیری نمونه‌ها از ابتدا تا انتهای مطالعه نشان داده شده است. مشاهده می‌شود در انتهای مطالعه وزن گروه EX تقریبا برابر با گروه ND بوده و گروه preD بالاترین وزن را دارد.



شکل۲- تست تحمل گلوکز از هفته ۱۲ تا انتهای مداخله. الف) روند تغییر قند خون پس از قند خون ناشتا و تزریق گلوکز. ب) سطح زیر منحنی الف. ج) روند افزایش وزن گروه‌ها.
**** معناداری preD در مقابلND در سطح p <0.01 . ++ معناداری EX در مقابلpreD در سطح p <0.01**

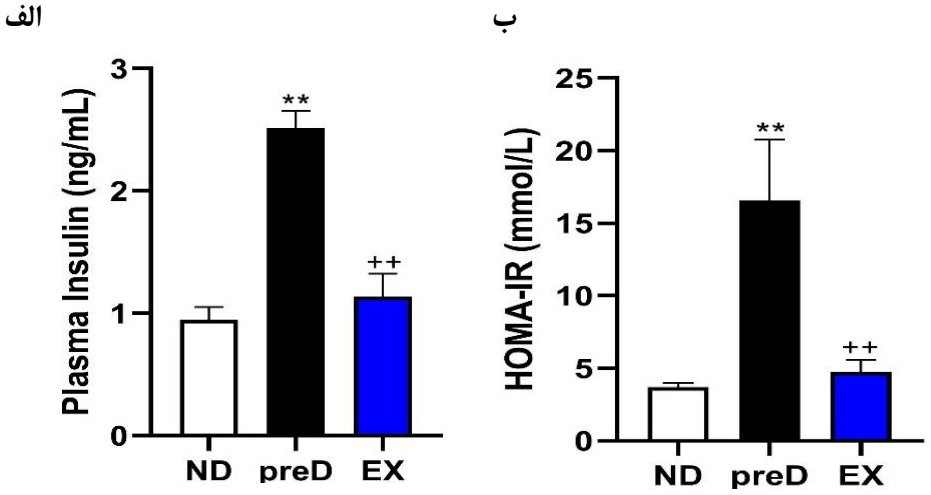
جدول شماره ۲ همچنین نشان دهنده وزن بافت چربی، وزن کبد و نسبت وزن بافت کبد به وزن کل بدن نمونه‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس داده های جدول ۲ (علی رغم معنادار نبودن) کمترین توده بافت

چربی احشائی مربوط به گروه تمرین استقامتی است. همچنین نسبت وزن بافت کبد در گروه نرمال به سایر گروه‌ها پائین‌تر است.

جدول ۲-وزن بافت‌ها و نسبت وزن کبد به وزن بدن

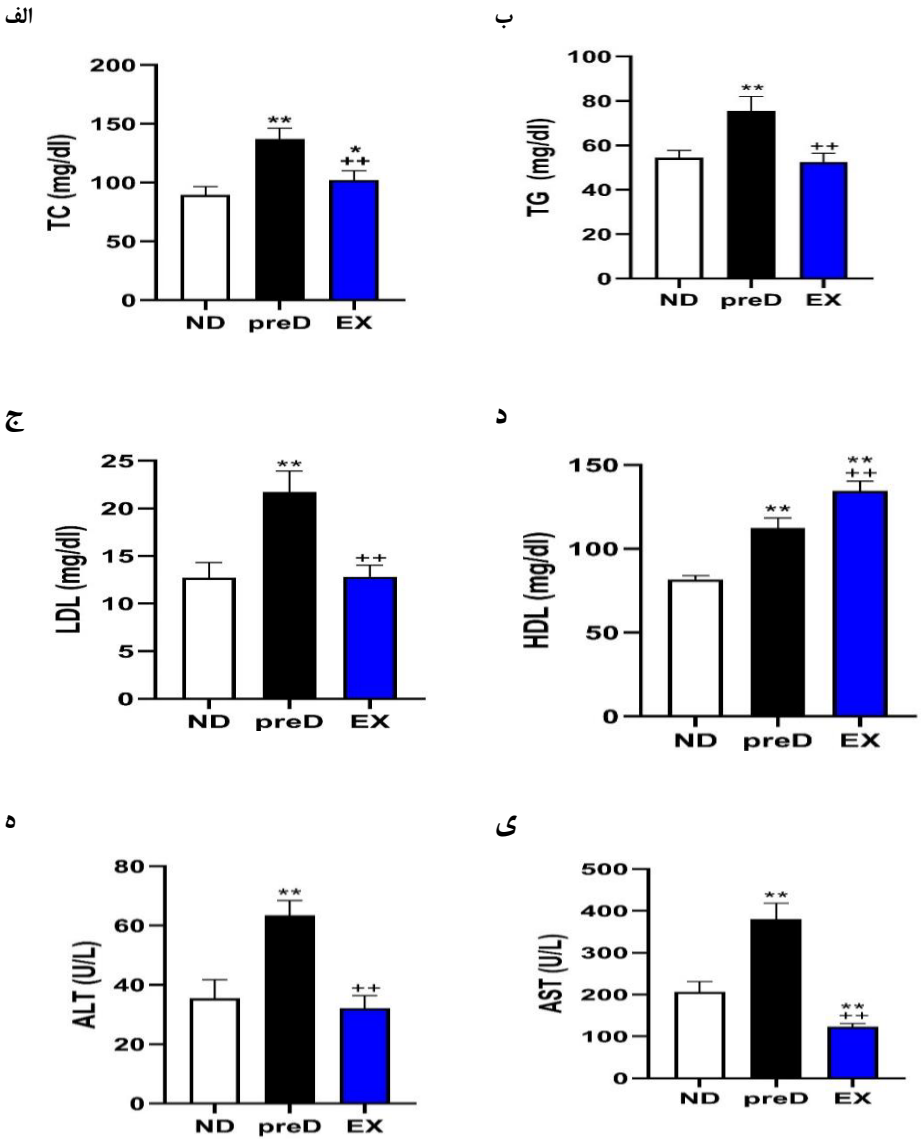
نام گروه	وزن کبد (گرم) میانگین± انحراف معیار	وزن چربی احشائی (گرم) میانگین± انحراف معیار	نسبت وزن کبد به وزن بدن میانگین± انحراف معیار
ND	۳/۸۷ ± ۰/۷۲	۰/۵۰ ± ۰/۰۸	۰/۱۳ ± ۰/۰۰۳
preD	۴/۸۵ ± ۰/۷۳	۰/۵۰ ± ۰/۱۴	۰/۱۴ ± ۰/۰۰۴
EX	۴/۷۲ ± ۰/۳۶	۰/۴۵ ± ۰/۱۰	۰/۱۴ ± ۰/۰۱

سطح انسولین پلاسما نمونه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. در شکل۳-الف افزایش سطح انسولین پلاسما به شکل معنادار در بین گروه نرمال و پیش دیابت دیده می‌شود. مداخلات مورد نظر به ویژه تمرینات ورزشی توانسته‌اند در کاهش سطح انسولین موثر باشند. اگرچه نتوانسته آن را به سطح اولیه نرمال برسانند اما توانسته‌اند کاهش معناداری در سطح انسولین پلاسما در مقایسه با گروه پیش دیابت به همراه داشته باشند. شاخص HOMA نیز در شکل ۳-ب نشان داده شده است که تفاوت معنادار میان گروه نرمال و پیش دیابت را نشان می‌دهد. براساس این شکل تمرینات ورزشی توانسته به میزان بالایی حساسیت انسولینی را به سطوح نرمال نزدیک نمایند.



شکل۳- الف) سطح انسولین پلاسما. ب) شاخص مقاومت انسولینی HOMA در گروه‌های نرمال، پیش‌دیابت و ورزش. ** معناداری preD در مقابلND در سطح p <0.01 . ++ معناداری EX در مقابلpreD در سطح p <0.01.

شکل ۴ نشان دهنده پروفایل لیپیدی در گروه‌های مورد مطالعه است. سطح کلسترول در شکل ۴-الف میان گروه نرمال و گروه پیش دیابت تفاوت معناداری را نشان می‌دهد که در آن پیش دیابت منجر به افزایش کلسترول پلاسما شده و تمرینات ورزشی آن را کاهش داده و به سطوح نرمال نزدیک کرده است.



شکل٤- الف) سطح کلسترول تام (TC)، ب) سطح تری‌گلیسرید (TG)، ج) سطح لیپوپروتئین کم‌چگال (LDL)، د) سطح لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) ه) سطح آلانین ترانس‌آمیناز (ALT)، ی) سطح آسپارتات ترانس‌آمیناز (AST) در گروه‌های نرمال، پیش‌دیابت و ورزش. ** معناداری preD در مقابلND در سطح p <0.01 . * معناداری preD در مقابلND در سطح p <0.05 ++ معناداری EX در مقابلpreD در سطح p <0.01

شکل ۴-ب نشان دهنده سطوح تری‌گلیسیرید است و مشخص می‌کند پیش دیابت منجر به افزایش معنادار TG شده که تمرینات استقامتی به شکل معناداری سطح آن را کاهش دادند. شکل ۴-ج میزان LDL را نشان می‌دهد که مشخص شده است به دنبال افزایش معنادار آن در پلاسمای موش های پیش‌دیابت نسبت به گروه نرمال، تمرینات استقامتی توانست آن را به شکل معنادار کاهش دهد و در نهایت شکل ۴-د نشان دهنده سطح HDL در آزمودنی‌ها بوده و نشان می‌دهد با مصرف رژیم غذائی پرچرب میزان آن در گروه پیش دیابت افزایش یافت. نکته قابل توجه افزایش معنادار این فاکتور در گروه ورزشی، به مراتب بالاتر از گروه نرمال است. تغییرات آنزیم ALT و AST در موش‌ها در شکل ۴-ه و ۴-ی نشان داده شده است و مشخص می‌گردد پیش دیابت منجر به سطح آسیب معناداری به بافت کبد شده و ورزش می‌تواند به شکل معناداری آن را کاهش دهد.

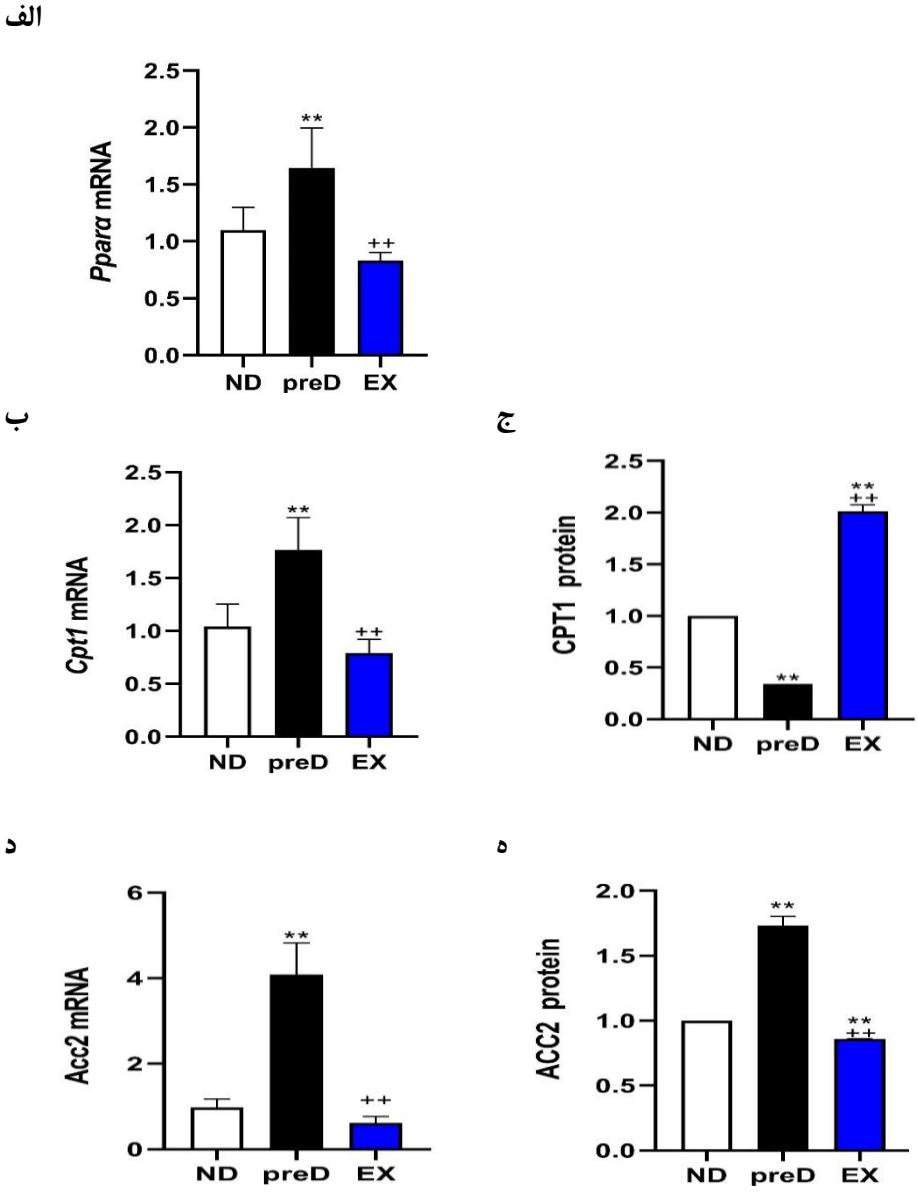
فاکتورهای اصلی نشان دهنده بتااکسیداسیون در کبد Ppar-α و Cpt1 هستند. سطح تغییرات بیان ژن *Ppar-α* در تصویر۵-الف نشان داده شده است. تغییرات معنادار در افزایش این ژن در پاسخ به پیش‌دیابت مشاهده می شود و همچنان که مشخص شده ، تمرینات استقامتی کاهش معنادار آن را به دنبال داشت اند. در شکل ۵-ب تغییرات بیان ژن *Cpt1* نشان داده شده است. همانند*Ppar-α* ، سطح بیان ژن *Cpt1* هم در پاسخ به پیش‌دیابت افزایش و در پاسخ به تمرینات استقامتی کاهش معنادار یافته است. نکته جالب توجه، در تفاوت نتایج مربوط به بتااکسیداسیون در سطح غلظت پروتئین و بیان ژن است که کاهش قابل توجه پروتئین CPT1 به نسبت موش های نرمال، در موش‌های پیش دیابت را نشان می‌دهد (شکل ۵-ج) و در راستای همین نتایج شاهد افزایش بتا اکسیداسیون در تمرین ورزشی با افزایش غلظت پروتئین CPT1 هستیم.

در شکل ۵-د سطح بیان ژن *Acc2* در گروه‌ها نشان داده شده است که تفاوت معنادار و افزایش آن را در گروه پیش‌دیابت را نشان می‌دهد بعلاوه که کاهش بیان این ژن در پاسخ به تمرین استقامتی نیز نشان داده شده است. در شکل ۵-ه تغییرات پروتئینی این فاکتور نشان داده شده است و همانطور که مشخص است افزایش معنادار آن در پاسخ به پیش‌دیابت به منزله مهار بتااکسیداسیون و کاهش معنادار آن در پاسخ به تمرینات ورزشی به خوبی نشان داده شده است.

بحث و بررسی:

HFD و سبک زندگی بی تحرک از عوامل خطر برای ابتلا به دیابت نوع ۲ هستند که منجر به افزایش مرگ و میر می شود (۱۶). همچنین عملکرد نامتعارف کبد منجر به ایجاد اختلالات متابولیک می‌شود که بر نقش محوری کبد در متابولیسم انرژی تاکید می کند (۱۷). HFD تجمع چربی در کبد را افزایش می دهد که می‌تواند تاثیر انسولین در کبد را کاهش دهد و در نتیجه به افزایش انسولین در گردش (هایپرانسولینمیا) منجر می‌شود که پیش دیابت و دیابت نوع ۲ را به همراه دارد (۱۸). پیش دیابت با اختلال گلوکز ناشتا (IFG[1]) و اختلال تحمل گلوکز (IGT[2]) نهایتا منجر به دیابت می‌شود، بنابراین درمان شرایط پیش دیابت می تواند استراتژی مناسبی برای پیش-گیری از دیابت باشد (۱۹).

[1] Impaired Fasting Glucose
[2] Impaired Glucose Tolerance



شکل۵- الف) سطح بیان ژن *Ppara* نسبت به 18s ب) سطح بیان ژن *Cpt1* نسبت به 18s ج) سطح غلظت پروتئین CPT1 نسبت به β-actin د) سطح بیان ژن *Acc2* نسبت به 18s ه) سطح غلظت پروتئین ACC2 نسبت به β-actin در گروه‌های نرمال، پیش‌دیابت و ورزش. ** معناداری preD در مقابلND در سطح p <0.01 . * معناداری preD در مقابلND در سطح p <0.05 ++ معناداری EX در مقابلpreD در سطح p <0.01

پیش از این مشخص شده که ورزش منظم اثرات مفیدی بر مدیریت گلوکز و چربی در کبد دارد زیرا می تواند مصرف FA را افزایش و تجمع چربی را کاهش داده تا حساسیت انسولینی را در کبد بهبود بخشد (۲۰, ۲۱). از این رو در مطالعه حاضر اثر ۱۰ هفته تمرین استقامتی بر بتااکسیداسیون بافت کبد در شرایط پیش‌دیابت مورد بررسی قرار گرفت.

رژیم غذائی پرچرب در وهله اول منجر به القای پیش‌دیابت شد. سپس در فاز دوم مطالعات پس از اندازه‌گیری وزن، وزن بافت چربی، قند خون، انسولین و فاکتورهای بیوشیمیائی در سرم، نشان داده شد که مصرف HFD در گروه preD منجر به شکل‌گیری پیش‌دیابت در آزمودنی‌ها شده است و همانطور که انتظار می رفت، تمرینات ورزشی به طور قابل توجهی منجر به کاهش این موارد شده است. مشخص شده است که تمرینات ورزشی با افزایش جذب گلوکز عضلانی و افزایش حساسیت به انسولین، سطوح انسولین و FBG را کاهش می‌دهد (۲۰, ۲۱). در این مطالعه، تمرین ورزشی تاثیر بالائی در کاهش سطوح FBG، HOMA-IR و انسولین نشان می‌دهد. این امر می‌تواند ناشی از تاثیر تمرین بدنی بر محتوای میتوکندری و مخزن آنزیم‌های متابولیسم انرژی مانند سیترات سنتاز باشد که منجر به استفاده بیشتر از کربوهیدرات در طول تمرینات می‌شود (۲۲). این سازگاری ها در هموستاز گلوکز کل بدن نقش دارند و شاید بتوان از تمرینات استقامتی به عنوان رویکرد کاملا غیردارویی در بهبود سندروم متابولیک استفاده نمود.

افزایش مارکرهای TC، TG و LDL ، در آزمودنی‌های پیش‌دیابت، نسبت به گروه ND مشهود بود. در همین حال، افزایش‌های ناشی از HFD در سطوح TC، TG و LDL با تمرین ورزشی بهبود یافت و به طور خاص، سطح LDL با ورزش تا سطح گروه ND کاهش یافت، که نشان می‌دهد تمرینات استقامتی می‌توانند به کاهش پروفایل لیپیدی در پیش‌دیابت کمک کنند. این نتایج می تواند با اثر تمرین ورزشی بر مدولاسیون پروپروتئیناز سوبتیلیسین ککسین ۹ (PCSK9[1]) مرتبط باشد، زیرا مهار PCSK9 باعث افزایش جذب LDL از طریق گیرنده آن می شود (۲۳). قابل ذکر است که گروه pre-D افزایش قابل توجهی در سطح HDL در مقایسه با گروه ND نشان داد. این نتیجه مطابق با مطالعات قبلی است که پیشنهاد می‌کردند HFD می‌تواند سطوح HDL را با افزایش نرخ انتقال و کاهش نرخ‌های کاتابولیک کسری HDL افزایش دهد (۲۴). گروه EX افزایش سطح HDL را نشان داد که تمرین ورزشی می تواند لسیتین–کلسترول آسیل ترانسفراز را افزایش دهد، که منجر به افزایش کلسترول در HDL و در نتیجه افزایش HDL در گردش می شود(۲۵). در این بخش ذکر این نکته حائز اهمیت است که علی رغم افزایش HDL در گروه پیش‌دیابت، تمرینات ورزشی توانسته است این فاکتور را به میزان بسیار بالاتری، حتی به نسبت گروه نرمال افزایش دهد.

سطح آنزیم‌های AST و ALT در موش‌های گروه پیش‌دیابت به نسبت گروه نرمال افزایش داشته است. با توجه به رابطه بین تجمع چربی و سطح این آنزیم‌ها به واسطه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد (۲۶)، می‌توان استدلال کرد که افزایش سطح ALT و AST در گروه پیش‌دیابت هم راستا با افزایش وزن بدن و بافت چربی مطابق داده‌های جدول ۲ است. با افزایش وزن بافت چربی در گروه پیش‌دیابت، سطح تولید رادیکال‌های آزاد بالا رفته که به دنبال آن این آنزیم ها به عنوان شاخص آسیب به بافت کبد (۲۷) افزایش یافته اند. در همین راستا، گروه تمرین استقامتی میزان AST و ALT را به شکل معناداری کاهش دادند. در نتیجه با استناد بر جدول یک و آنچه گفته

[1] Proprotein convertase subtilisin/Kexin type 9

شد می‌توان دلیل احتمالی کاهش این مقادیر تحت تمرین استقامتی را بر اساس توده چربی کمتر این نمونه‌ها دانست. در واقع به طور کلی تمرین استقامتی با افزایش مصرف اسید های چرب در حین فعالیت تجمع آن‌ها را در غالب بافت چربی سفید کاهش می‌دهد (۴).

PPAR-α برای تنظیم بیان آنزیم های کلیدی β اکسیداسیون ، از جمله CPT-1 شناخته شده است (۲۸). مانند مطالعات پیشین افزایش قابل توجه در بیان ژن Ppar-α در پاسخ به HFD مشاهده شد (۲۹). این اثر HFD را می توان با تولید FA در سلول های کبدی توسط آنزیم FASN توضیح داد زیرا ممکن است به عنوان لیگاند PPAR-α عمل کند (۱۰). الگوهای بیان ژن و پروتئین CPT1 نتایج متضادی را نشان می‌دهند. بنا بر ماهیت آنزیمی CPT1، حضور این ماده در حالت غلظت پروتئین نشان‌گر دقیق‌تری از میزان آن است. نتایج مطالعه پیش رو نشان می‌دهد در سطح غلظت پروتئین HFD منجر به کاهش CPT1 و انجام تمرینات ورزشی منجر به افزایش این مارکر شده است. از این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت تمرین استقامتی منجر به بهبود شرایط پیش دیابت و مصرف بالاتر FA شده است. از دلایل احتمالی برای این تفاوت در سطح بیان ژن و پروتئین میتوان به نیمه عمر mRNA، پایداری mRNA و کنترل‌های مختلف پس از رونویسی اشاره کرد (۳۰, ۳۱).

ACC2 در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد و کربوکسیلاسیون استیل-CoA را برعهده دارد تا مالونیل-CoA را تولید نماید. مالونیل کوآ تولید شده توسط ACC2 ، فعالیت CPT1 را مهار می کند (۳۲). بنابراین، مهار ACC2 منجر به افزایش اکسیداسیون لیپیدها می شود (۱۴). در این مطالعه، HFD بیان ACC2 را در هر دو سطح بیان ژن و پروتئین افزایش داد و تمرین استقامتی، تأثیر ناشی از HFD بر ACC2 را به شکل معناداری کاهش داد.

نتیجه گیری

در این مطالعه القای پیش‌دیابت با مصرف HFD به شکل موفقیت آمیزی شکل گرفت. تغییرات حاصل از این سندروم متابولیکی در گردش خون و بافت کبد به صورت افزایش قندخون، کاهش حساسیت انسولینی، افزایش مارکرهای لیپیدی در پلاسما همراه با برهم خوردن بتااکسیداسیون بافت کبدی نشان داده شد. تمامی یافته ها روی هم رفته نشان می‌دهد تمرین استقامتی به شکل بسیار موثر در کاهش این علائم و بازگشت به سطح نرمال موثر بوده است. درواقع، این یافته ها نشان می دهد که ورزش منظم یک استراتژی غیر داروئی موثر برای جلوگیری از پیش‌دیابت است. بنابرای می‌توان نتیجه گرفت شناسائی به موقع علائم و تشخیص پیش‌دیابت قبل از ابتلای بیمار به دیابت نوع ۲ بسایز حائز اهمیت است چراکه در این مرحله می‌توان با استفاده از تمرین استقامتی به شکل موثر در درجه اول بدون عوارض جانبی دارو تنها با ورزش او را به سطح نرمال بازگرداند و در درجه دوم از ابتلای شمار بیشتری از افراد به دیابت نوع ۲ و نیاز به دارو و هزینه‌های گزاف درمان پیشگیری نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله از پایان‌نامه دوره دکتری تخصصی مصوب و دفاع شده در دانشگاه اصفهان استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارکنان محترم پژوهشگاه رویان اصفهان و دانشگاه اصفهان و هیئت داوران پایان‌نامه که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام کنند.

تضاد منافع

همه نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

سهم نویسندگان

سمانه شیرخانی: طراحی مطالعه پژوهش، گردآوری داده های مقاله، نگارش و تجزیه و تحلیل و تفسیر داده های مقاله، سید محمد مرندی و محمد حسین نصر اصفهانی : نگارش مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله، میلاد عبداللهی، زهرا صفائی‌نژاد، فاطمه جانقربان، زهرا قوی: مسئولیت های عمومی در اجرای عملیات پژوهشی

منابع

1. Wei Y, Hong Y, Hou P, Xu X. Effect of sugar-free Qishan granules on glucose and lipid metabolism and insulin resistance in a rat model of prediabetes. Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan. 2019;39(4):535-41.
2. Sabag A, Way KL, Sultana RN, Keating SE, Gerofi JA, Chuter VH, et al. The Effect of a Novel Low-Volume Aerobic Exercise Intervention on Liver Fat in Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. Diabetes care. 2020;43(10):2371-8.
3. Zou Y, Qi Z. Understanding the Role of Exercise in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: ERS-Linked Molecular Pathways. Mediators of inflammation. 2020;2020:6412916.
4. Hoene M, Li J, Li Y, Runge H, Zhao X, Häring HU, et al. Muscle and liver-specific alterations in lipid and acylcarnitine metabolism after a single bout of exercise in mice. Scientific reports. 2016;6:22218.
5. Li YP, Xiao J, Liang X, Pei Y, Han XF, Li CX, et al. DPP-4 inhibition resembles exercise in preventing type 2 diabetes development by inhibiting hepatic protein kinase C(ε) expression in a mouse model of hyperinsulinemia. The Journal of international medical research. 2020;48(6):300060520934635.
6. Bacchi E, Negri, C., Targher, G., Faccioli, N., Lanza, M., Zoppini, G., Zanolin, E., Schena, F., Bonora, E. and Moghetti, P. 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;58:1287-95.
7. Cheng S, Ge J, Zhao C, Le S, Yang Y, Ke D, et al. Effect of aerobic exercise and diet on liver fat in pre-diabetic patients with non-alcoholic-fatty-liver-disease: A randomized controlled trial. Scientific reports. 2017;7(1):15952.
8. Iozzo P, Takala T, Oikonen V, Bergman J, Grönroos T, Ferrannini E , et al. Effect of training status on regional disposal of circulating free fatty acids in the liver and skeletal muscle during physiological hyperinsulinemia. Diabetes care. 2004;27(9):2172-7.

9. Rowan CP, Riddell MC, Gledhill N, Jamnik VK. Aerobic Exercise Training Modalities and Prediabetes Risk Reduction. Medicine and science in sports and exercise. 2017;49(3):403-12.
10. Rui L. Energy metabolism in the liver. Comprehensive Physiology. 2014;4(1):177-97.
11. Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Prieto-Hontoria P, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Impact of dietary lipoic acid supplementation on liver mitochondrial bioenergetics and oxidative status on normally fed Wistar rats. International journal of food sciences and nutrition. 2019;70(7):834-44.
12. van der Leij FR, Bloks VW, Grefhorst A, Hoekstra J, Gerding A, Kooi K, et al. Gene expression profiling in livers of mice after acute inhibition of beta-oxidation. Genomics. 2007;90(6):680-9.
13. Kojta I, Zabielski P, Roszczyc-Owsiejczuk K, Imierska M, Sokołowska E, Błachnio-Zabielska A. GPAT Gene Silencing in Muscle Reduces Diacylglycerols Content and Improves Insulin Action in Diet-Induced Insulin Resistance. International journal of molecular sciences. 2020;21.(۱۹)
14. Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M ,Ominami H, Suzuki Y, et al. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2011;300(1):E122-33.
15. Abdollahi M, Marandi SM, Ghaedi K, Safaeinejad Z, Kazeminasab F, Shirkhani S, et al. Insulin-Related Liver Pathways and the Therapeutic Effects of Aerobic Training, Green Coffee, and Chlorogenic Acid Supplementation in Prediabetic Mice. Oxidative medicine and cellular longevity. 2022;2022:5318245.
16. Hamasaki H. Daily physical activity and type 2 diabetes: A review. World J Diabetes. 2016;7(12):243-51.
17. Seo DY, Park SH, Marquez J, Kwak H-B, Kim TN, Bae JH, et al. Hepatokines as a Molecular Transducer of Exercise. J Clin Med. 2021;10(3):385.
18. Li Y-P, Xiao J, Liang X, Pei Y, Han X-F, Li C-X, et al. DPP-4 inhibition resembles exercise in preventing type 2 diabetes development by inhibiting hepatic protein kinase C_ε expression in a mouse model of hyperinsulinemia. J Int Med Res. 2020;48(6):300060520934635.
19. Zand A, Ibrahim K, Patham B. Prediabetes: Why Should We Care? Methodist DeBakey cardiovascular journal. 2018;14(4):289-97.
20. Stevanović J, Beleza J, Coxito P, Ascensão A, Magalhães J. Physical exercise and liver "fitness": Role of mitochondrial function and epigenetics-

related mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease. Molecular metabolism. 2020;32:1-14.
21. Abreu P, Vitzel KF, Monteiro IC, Lima TI, Queiroz AN, Leal-Cardoso JH, et al. Effects of endurance training on reduction of plasma glucose during high intensity constant and incremental speed tests in Wistar rats. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 2016;49(11) e5226.
22. Dupuit M, Chavanelle V, Chassaing B, Perriere F, Etienne M, Plissonneau C, et al. The TOTUM-63 Supplement and High-Intensity Interval Training Combination Limits Weight Gain, Improves Glycemic Control, and Influences the Composition of Gut Mucosa-Associated Bacteria in Rats on a High Fat Diet. 2021;13(5):1569.
23. Wang Y, Xu D. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. Lipids in health and disease. 2017;16(1):132.
24. Hayek T, Ito Y, Azrolan N, Verdery RB, Aalto-Setälä K, Walsh A, et al. Dietary fat increases high density lipoprotein (HDL) levels both by increasing the transport rates and decreasing the fractional catabolic rates of HDL cholesterol ester and apolipoprotein (Apo) A-I. Presentation of a new animal model and mechanistic studies in human Apo A-I transgenic and control mice. The Journal of clinical investigation. 1993;91(4):1665-71.
25. Mann S, Beedie C, Jimenez A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. Sports medicine (Auckland, NZ). 2014;44(2):211-21.
26. Cui B, Liu S, Lin X, Wang J, Li S, Wang Q, et al. Effects of Lycium barbarum aqueous and ethanol extracts on high-fat-diet induced oxidative stress in rat liver tissue. Molecules (Basel, Switzerland). 2011;16(11):9116-28.
27. Amernia B, Moosavy SH, Banookh F, Zoghi G. FIB-4, APRI, and AST/ALT ratio compared to FibroScan for the assessment of hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease in Bandar Abbas, Iran. BMC gastroenterology. 2021;21(1):453.
28. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Journal of hepatology. 2015;62(3):720-33.
29. Gavito AL, Bautista D, Suarez J, Badran S, Arco R, Pavón FJ, et al. Chronic IL-6 Administration Desensitizes IL-6 Response in Liver, Causes Hyperleptinemia and Aggravates Steatosis in Diet-Induced-Obese Mice. PloS one. 2016;11(6):e0157956.

30. Guimaraes JC, Rocha M, Arkin AP. Transcript level and sequence determinants of protein abundance and noise in Escherichia coli. Nucleic acids research. 2014;42(8):4791-9.
31. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. Genome Biol 4: 117. Genome biology. 2003;4:117.
32. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. Comprehensive Physiology. 2017;8(1):1-8

The effect of endurance training on lipid metabolism in liver of prediabetic mice

Samaneh Shirkhani[1], Sayyed Mohammad Marandi*[1], Milad Abdollahi[1], Fatemeh Janghorban[1], Zahra ghavi[1], Zahra Safayinejad[2], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani*[2]

1 Department of Sports Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2 Department of Animal Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

*Corresponding authors:
s.m.marandi@spr.ui.ac.ir
mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Abstract

Objectives: Prediabetes is a risk factor in diabetes and therefore a healthy lifestyle is important to prevent pre-diabetes. This study aimed to determine the effect of endurance training on hepatic lipid metabolism in prediabetic C57BL/6 male mice.

Methods: 21 mice were randomly divided into two groups. One was fed a normal diet (n=7, ND), and the other was fed a high-fat diet (n=14, HFD) for 12 weeks. After 12 weeks of initial maintenance, HFDs were subjected to a glucose tolerance test (GTT) and they were divided into two groups: exercise (EX) and pre-diabetes (preD). The training group trained for 45 minutes, 5 days a week, for 10 weeks. 24 hours before sacrifice, weighing and GTT were performed, and then the plasma and liver were obtained. The values of acetyl cocarboxylase beta (ACC2), carnitine palmitol transferase 1 (CPT1) and peroxisome receptor alpha were used to evaluate beta oxidation. Data interpretation was done using one-way analysis of variance with a significance level of $p < 0.05$.

Results: In preD, weight, glucose, insulin, insulin resistance, and lipid profile experienced a significant increase compared to ND. In the EX, the mentioned factors were associated with a significant decrease ($p < 0.01$). CPT1 protein concentration, as a key factor of β-oxidation, decreased in preD the group, and ACC2, which is its inhibitor, increased. Endurance training improved fatty acid metabolism in the liver by reversing the expression process of these factors.

Conclusion: Generally, preD caused changes associated with β-oxidation in the liver, while it seems that endurance training improved all. These findings show that regular exercise is probably an effective nonpharmacological approach for pre-diabetes.

Key words: Prediabetes, Liver, Lipogenesis, β-oxidation, Exercise.