



## Research Paper

## The effect of moderate-intensity interval training combined with nanoemulsified betaine supplementation on the expression of the inflammatory gene CD28 in hepatocyte cells, serum urea, creatinine levels, and lipid profile of obese mice

Mahdiyeh Poursoltani Zarandi<sup>1</sup>, Amir Sarshin<sup>2\*</sup>, Alireza Rahimi<sup>3</sup>, Fuad Feizolahi<sup>2</sup>

Received: Jan 23, 2025

Revised: Apr 07, 2025

Accepted: Apr 11, 2025

### Article info

1. PhD Student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Culture and Communication, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2. Assistant Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Culture and Communication, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
3. Associate Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Culture and Communication, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

### \*Corresponding Author Address:

Department of Exercise Physiology,  
Karaj Branch, Islamic Azad University,  
Karaj, Iran;

Email: Amsarshin@gmail.com

### Extended Abstract

**Background and Aim:** Obesity, resulting from a chronic imbalance between energy intake and energy expenditure, is widely increasing and is considered a major risk factor for numerous pathological conditions. Excessive energy intake—particularly from high fat diets—leads to abnormal accumulation of triglycerides (TG) within hepatocytes, promoting hepatic steatosis and the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Obesity often leads to chronic low-grade inflammation, increased insulin resistance, and metabolic disorders in adipose tissue and liver. The CD28 protein acts as a co-stimulatory receptor essential for the full activation of T lymphocytes and plays an important role in the induction of low-grade inflammation in obesity. Exercise is considered a major regulator of liver metabolism by stimulating beta-oxidation and reducing lipogenesis. Studies have shown that choline and betaine supplementation can reduce hepatic steatosis by reducing hepatic and blood TG levels and stimulating lipolysis. Given the established benefits of aerobic exercise in improving hepatic lipid metabolism and inflammatory status, along with emerging evidence supporting the fat-reducing and anti-inflammatory effects of betaine, a combined intervention may exert synergistic benefits. These effects may be mediated, at least in part, through modulation of inflammation-related pathways, particularly CD28 signaling. However, the interactive effects of aerobic exercise and betaine supplementation on these parameters in obesity remain largely unexplored, and existing findings regarding their independent effects are inconsistent. Therefore, the present study

### Cite this article:

Poursoltani Zarandi M, Sarshin A, Rahimi A, Feizolahi F. The effect of moderate-intensity interval training combined with nanoemulsified betaine supplementation on the expression of the inflammatory gene CD28 in hepatocyte cells, serum urea, creatinine levels, and lipid profile of obese mice. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*. 2026;14(37):86-103. <https://doi.org/10.22077/jpsbs.2025.8814.1945>



aimed to investigate the combined effects of moderate-intensity interval training and nanoemulsified betaine supplementation on hepatic CD28 gene expression, serum urea and creatinine levels, and lipid profile in obese mice.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 25 male Wistar rats (8 weeks old; body weight  $270 \pm 20$  g) were housed in special cages in an environment with an average temperature of  $22 \pm 1.4$  °C, humidity of  $55 \pm 4\%$ , and a light-dark cycle of 12:12 h. All animals had free access to water and special rat food. They were then randomly divided into 5 groups (5 rats in each group) including healthy, obese, obese+supplement, obese+exercise, and obese+supplement+exercise. Obesity was induced by feeding the designated groups a high-fat, high-cholesterol diet for 12 weeks. To confirm obesity induction, blood samples were collected from the tail vein at the end of the dietary intervention and prior to the commencement of exercise and supplementation protocols. Following obesity induction, rats in the exercise groups performed moderate-intensity interval aerobic training on a motorized treadmill for 8 weeks, 5 days per week, with progressive overload. During the first week, the protocol consisted of 10 intervals of 1-min running at 10 m/min, interspersed with 2-min active recovery at 5 m/min. Running speed during the work intervals was gradually increased, reaching 16 m/min by weeks 4–8. Nanoemulsified betaine was prepared using high-amplitude ultrasonication to enhance serum stability and bioavailability. The supplement was administered via oral gavage at a dose of 50 mg/kg body weight prior to each exercise session. Rats in the obese+supplement+exercise group received both interventions. At the end of the intervention period, hepatic tissue samples were collected for analysis of CD28 gene expression using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Serum lipid profile, including total cholesterol (TC), TG, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), was measured using standard enzymatic assays. Serum urea and creatinine levels were also assessed as indicators of renal function. Data were analyzed using independent t, two-way ANOVA, and Bonferroni post hoc tests at a significance level of  $p \leq 0.05$ .

**Results:** Independent t-test analysis demonstrated that obesity significantly increased hepatic CD28 gene expression, TG, TC, LDL-C, and creatinine ( $p=0.0001$ ) serum, as well as urea levels ( $p=0.02$ ), while significantly decreasing HDL-C levels ( $p=0.0001$ ). Two-way ANOVA results (Table 1), followed by Bonferroni post hoc tests, revealed that 8 weeks of moderate-intensity interval training significantly reduced CD28 gene expression in obese rats ( $p=0.0001$ ). This training intervention also resulted in significant reductions in TG, TC, LDL-C, and creatinine ( $p=0.0001$ ), as well as urea ( $p=0.002$ ) levels, accompanied by a significant increase in HDL-C ( $p=0.01$ ). Similarly, supplementation with nanoemulsified betaine led to a significant decrease in CD28 gene expression ( $p=0.0001$ ), TG, TC, LDL-C, and creatinine levels ( $p=0.0001$ ), along with a significant increase in HDL-C ( $p=0.01$ ). However, nanoemulsified betaine supplementation did not significantly affect serum urea levels in obese rats. Furthermore, two-way ANOVA and Bonferroni post hoc analyses indicated a significant interaction effect between moderate-intensity interval training and nanoemulsified betaine supplementation on CD28 expression ( $p=0.04$ ), LDL-C ( $p=0.0001$ ), TC ( $p=0.0001$ ), and creatinine ( $p=0.005$ ) levels. No significant interaction effect was observed for serum urea levels.

**Conclusion:** The findings of the present study demonstrate that interval aerobic training and nanoemulsified betaine supplementation, each alone, reduced TG, TC, LDL-C levels and increased HDL-C. Aerobic training (especially moderate intensity) increases muscle TG utilization and leads to improved fat oxidation. In addition, nanoemulsified betaine supplementation effectively reduced hepatic and circulating TG levels, likely through the stimulation of lipolysis and hepatic  $\beta$ -oxidation, which may attenuate fat accumulation in the liver of obese subjects. The results further indicate that both interval aerobic training and nanoemulsified betaine supplementation, individually and synergistically, significantly reduced CD28 gene expression, a key marker associated with obesity-related inflammation. The underlying mechanisms through which the combined intervention exerts its beneficial effects on fat mass and inflammatory status may involve improved regulation of lipid metabolism, reduced insulin resistance, and enhanced mitochondrial function. Notably, the combined application of moderate-intensity interval training and nanoemulsified betaine supplementation

Table1. Descriptive and comparison of dependent variables.

Variables	groups	Mean±SD	F	p	Eta squared Partial $\eta^2$
CD28 (mRNA) (relative expression)	Exercise	0.54±0.18	49.65	0.0001*	0.75
	Supplement	0.50±0.05	61.11	0.0001**	0.79
	Supplement+Exercise	0.24±0.03	4.84	0.04***	0.23
Urea (mg/dL)	Exercise	19.10±1.59	14.59	0.002*	0.47
	Supplement	22.10±1.51	0.004	0.95	0.00
	Supplement+Exercise	19.70±1.09	0.66	0.42	0.04
Creatinine (mg/dL)	Exercise	1.59±0.16	496.11	0.0001*	0.96
	Supplement	1.51±0.88	30.22	0.0001**	0.65
	Supplement+Exercise	1.09±0.77	48.46	0.0001***	0.75
Total cholesterol (mg/dL)	Exercise	181.60±8.10	271.90	0.0001*	0.94
	Supplement	209.20±9.88	108.78	0.0001**	0.87
	Supplement+Exercise	159±6.50	29.89	0.0001***	0.65
Triglyceride (mg/dL)	Exercise	103.8±3.10	82.04	0.0001*	0.83
	Supplement	104.40±2.4	77.40	0.0001**	0.82
	Supplement+Exercise	86.60±9.30	2.21	0.15	0.12
High density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	Exercise	24±3.80	7.82	0.01*	0.32
	Supplement	30±4.10	29.80	0.0001**	0.65
	Supplement+Exercise	38.4±8.01	0.86	0.36	0.05
Low density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	Exercise	138.70±12.30	185.37	0.0001*	0.92
	Supplement	160.64±13.80	96.45	0.0001**	0.85
	Supplement+Exercise	101±3.4	10.71	0.005***	0.40

\*Indicates a significant effect of interval aerobic training on the studied variables ( $p \leq 0.05$ ).

\*\* Indicates a significant effect of nanoemulsified betaine supplementation on the studied variables ( $p \leq 0.05$ ).

\*\*\* Indicates a significant interactive effect of interval aerobic training combined with nanoemulsified betaine supplementation on the studied variables. Significant level  $p \leq 0.05$ .

was particularly effective in modulating CD28 gene expression, highlighting its potential role in attenuating inflammatory signaling pathways associated with obesity. Furthermore, the significant improvements in lipid profiles and the reduction in serum creatinine levels support the modulatory effects of this combined intervention on obesity-induced metabolic disturbances and renal dysfunction. Overall, the observed interactive effects between exercise training and nanoemulsified betaine supplementation suggest that this combined approach may serve as a safe, practical, and non-pharmacological strategy for the prevention and management of metabolic complications associated with obesity through the modulation of metabolic pathways and inflammation-related cellular signaling.

**Keywords:** Physical activity, Nanoemulsified Betaine, Inflammation, Obesity.

**Ethical Considerations:** Ethical approval was obtained from the Ethics Committee of Islamic Azad University, Karaj Branch (Code: IR.IAU.K.REC.1403.65).

**Funding:** This research received no external funding. All study-related costs were covered by the researcher.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflicts of interest



## مقاله پژوهشی

## تاثیر تمرین تناوبی با شدت متوسط به همراه مکمل بتائین نانوامولسیفیه بر بیان ژن التهابی CD28 در سلول‌های هیپاتوسیتی، سطوح سرمی اوره، کراتینین و نیمرخ چربی موش‌های چاق

مهديه پورسلطانی زرندي<sup>۱</sup>، امير سرشين<sup>۲\*</sup>، عليرضا رحيمي<sup>۳</sup>، فواد فيض‌الهي<sup>۴</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۴

## اطلاعات مقاله

## چکیده

**زمینه و هدف:** افزایش شیوع چاقی و بیماری‌های همراه آن، از جمله دیابت و کبد چرب، بیانگر اهمیت تمرین منظم به عنوان یک راهبرد درمانی در کنترل چاقی است. افزون بر این، شواهد موجود حاکی از آن است که بتائین از طریق تعدیل متابولیسم چربی و گلوکز کبدی می‌تواند در بهبود چاقی مؤثر باشد. هدف این پژوهش بررسی تأثیر همزمان تمرین تناوبی با شدت متوسط به همراه مکمل بتائین نانوامولسیفیه بر بیان ژن التهابی CD28 در سلول‌های هیپاتوسیتی، سطوح سرمی اوره، کراتینین و نیمرخ چربی موش‌های چاق بود. **روش تحقیق:** در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به پنج گروه مساوی سالم، چاق، چاق + مکمل، چاق + تمرین، چاق + مکمل + تمرین تقسیم شدند. موش‌های چاق به مدت شش هفته با رژیم پرچرب تغذیه شدند. تمرین تناوبی شامل دویدن روی نوارگردان به مدت ۳۰ دقیقه و پنج روز در هفته، همراه با افزایش تدریجی شدت، به مدت هشت هفته انجام شد. گاوآژ مکمل بتائین نانوامولسیفیه (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) قبل از تمرین انجام گرفت. در پایان، بیان ژن CD28 با روش Real-Time PCR و سطوح سرمی کراتینین، اوره، تری‌گلیسرید، کلسترول تام (TC)، لیپوپروتئین کلسترول با چگالی کم (LDL-C) و لیپوپروتئین کلسترول با چگالی بالا (HDL-C) با بهره‌گیری از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری t مستقل و تحلیل واریانس دوعاملی در سطح معنی‌داری  $p \leq 0.05$  تجزیه و تحلیل شدند. **یافته‌ها:** چاقی موجب افزایش معنی‌دار میزان تری‌گلیسرید، TC، LDL-C، بیان ژن CD28، سطوح کراتینین ( $p=0.0001$ ) و اوره ( $p=0.02$ ) و موجب کاهش معنی‌دار HDL-C شد ( $p=0.0001$ ). تمرین و مکمل هر کدام به‌طور مستقل منجر به کاهش معنی‌دار بیان CD28 ( $p=0.0001$ )، TC، TG، LDL-C و سطوح کراتینین ( $p=0.0001$ ) و افزایش معنی‌دار میزان HDL-C ( $p=0.01$ ) شدند. در تعامل تمرین و مکمل، نیز اثر آماری معنی‌داری بر CD28 ( $p=0.04$ )، LDL-C ( $p=0.0001$ )، TC ( $p=0.0001$ ) و سطوح کراتینین ( $p=0.005$ ) مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** تمرین هوازی با شدت متوسط و مکمل بتائین نانوامولسیفیه، به صورت مستقل و ترکیبی، از طریق تأثیر بر شاخص‌های لیپیدی، التهابی و عملکرد کلیوی؛ می‌تواند در کاهش اثرات سوء چاقی در موش‌ها مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تناوبی، بتائین نانوامولسیفیه، التهاب، چاقی.

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشکده فرهنگ و ارتباطات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.  
 ۲. استادیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده فرهنگ و ارتباطات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.  
 ۳. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده فرهنگ و ارتباطات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

\* آدرس نویسنده مسئول: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، گروه فیزیولوژی ورزش؛

پست الکترونیک:

Amsarshin@gmail.com

## مقدمه

چاقی به عنوان نتیجه به هم خوردن تعادل بین انرژی دریافتی و انرژی مصرفی، به طور گسترده‌ای در حال افزایش است و عامل خطرزای اصلی اختلالات پاتولوژیکی مانند دیابت نوع دو، کبد چرب، التهاب کبدی و بیماری‌های قلبی-عروقی محسوب می‌شود. در شرایط دریافت انرژی اضافی، به‌ویژه از طریق غذای پرچرب، تری‌گلیسرید<sup>۱</sup> (TG) در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها تجمع غیرطبیعی یافته و استئاتوز<sup>۲</sup> کبدی را به وجود می‌آورد. کبد چرب غیرالکلی<sup>۳</sup> (NAFLD) یک التهاب کبدی است که ارتباط نزدیکی با برخی بیماری‌های متابولیک، مانند چاقی، دیابت، افزایش کلسترول و TG خون دارد (۱). در همین راستا، گزارش شده است شیوع استئاتوز کبدی در افراد چاق، حدود ۷۵ درصد است (۲). هم‌چنین، مطالعات نشان می‌دهند سطوح بالای کلسترول تام<sup>۴</sup> (TC)، لیپوپروتئین کلسترول با چگالی کم<sup>۵</sup> (LDL-C) و TG با بروز NAFLD همراه است (۳). از سوی دیگر، چاقی ارتباط نزدیکی با التهاب کبد و سطوح کراتینین و اوره دارد (۴). چاقی اغلب منجر به التهاب مزمن با درجه پایین، افزایش مقاومت به انسولین و اختلالات متابولیکی در بافت چربی و کبد می‌شود (۴). در همین راستا، در یک مطالعه سطوح بالاتری از اوره و کراتینین در افراد چاق در مقایسه با افراد سالم گزارش شده است (۵). در مجموع، شواهد نشان می‌دهد سطوح کراتینین و اوره ممکن است نشان دهنده التهاب کبد و اختلالات متابولیک در زمینه چاقی باشد. درک این روابط، برای توسعه راهبردهای درمانی التهاب کبد ناشی از چاقی، بسیار مهم است. علاوه بر این، گزارش شده است التهاب مزمن ناشی از چاقی، با تحریک پاسخ‌های ایمنی و التهابی همراه است (۶). پروتئین مجموعه تمایزی شماره ۲۸ (CD28)، به عنوان یک گیرنده تحریک‌کننده ضروری برای فعال‌سازی کامل لنفوسیت‌های T عمل می‌کند و نقش مهمی در تحریک التهاب درجه پایین در چاقی دارد (۷). این عامل، سیگنال‌های گیرنده سلول T (TCR) را افزایش می‌دهد و می‌تواند سبب فعال شدن مسیر التهابی عامل هسته‌ای

کاپا- $\beta$  (NF-kB) شود که خود یک عامل رونویسی در پاسخ‌های التهابی است. هم‌چنین، فعال شدن CD28 می‌تواند منجر به رونویسی انتخابی ژن‌های پیش‌التهابی به‌ویژه اینترلوکین-8 (IL-8)، عامل نکروزدهنده تومور-آلفا<sup>۸</sup> (TNF- $\alpha$ ) و اینترفرون-گاما<sup>۱۱</sup> (IFN- $\gamma$ ) و افزایش التهاب کبد، مقاومت به انسولین و چاقی گردد (۸).

شواهد نشان می‌دهند فعالیت ورزشی منظم، راهکار اساسی درمان چاقی و پیشگیری از بیماری‌های مزمن وابسته به آن می‌باشد (۹، ۱۰). فعالیت‌های ورزشی با تحریک بتااکسیداسیون و کاهش لیپوژنز، یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی متابولیسم کبد محسوب می‌شوند (۱۱). در همین راستا، مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۳ نشان داد تنها یک هفته تمرین ترکیبی هوازی و مقاومتی در آزمودنی‌های میانسال چاق مبتلا به NAFLD، می‌تواند به‌طور معنی‌داری شاخص تجمع چربی در کبد، دور کمر، نسبت دور کمر به دور لگن، TG و TC را بهبود بخشد (۱۲). در پژوهش دیگری، در سال ۲۰۲۲ گزارش شد شش هفته تمرین هوازی با شدت‌های پایین، متوسط و بالا در موش‌های مبتلا به NAFLD، منجر به بهبود معنی‌دار نیمرخ چربی خون (TG، TC و LDL-C) و وضعیت مورفولوژیک کبد به ویژه در گروهی شد که با شدت متوسط تمرین کرده بودند (۱۳). لیو<sup>۱۲</sup> و دیگران (۲۰۱۹) نشان دادند هشت هفته تمرین هوازی با شدت متوسط، در موش‌های چاق دیابتی، باعث کاهش معنی‌دار سطوح سرمی کراتینین، اوره، TG و فعالیت آنزیم‌های کبدی می‌شود (۱۴). متناقض با مطالعات فوق، در مطالعه دیگری گزارش شد شدت‌های مختلف ورزش هوازی دوچرخه‌سواری، سبب تغییرات معنی‌دار در ترکیب بدن و نیمرخ چربی زنان میانسال چاق نمی‌شود (۱۵). در سال‌های اخیر، به دلیل عواملی مانند عدم رضایت بیماران در مصرف داروهای شیمیایی و بروز عوارض جانبی، توجه پژوهشگران به درمان‌های جایگزین و سنتی همراه با فعالیت بدنی افزایش یافته است. در این راستا، یکی از محصولات طبیعی بتائین<sup>۱۳</sup> است که به عنوان تری متیل گلیسین<sup>۱۴</sup> و یک ماده طبیعی پایدار و غیرسمی که

1. Triglyceride

2. Steatosis

3. Non-alcoholic fatty liver disease

4. Total cholesterol

5. Low-density lipoprotein cholesterol

6. Cluster of Differentiation 28

7. T Cell Receptor

8. Nuclear factor kappa B

9. Interleukin-8

10. Tumor necrosis factor-alpha

11. Interferon gamma

12. Liu

13. Betaine

14. Trimethylglycine

موش‌های چاق بود.

### روش تحقیق

در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار هشت هفته‌ای با میانگین وزن بدن  $270 \pm 20$  گرم (تهیه شده از مرکز بافت و ژن پاسارگاد)، در محیطی با میانگین دمای  $22 \pm 1/4$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت  $55 \pm 4$  درصد و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت؛ در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات نگهداری شدند. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه موش دسترسی آزاد داشتند. حجم نمونه با نرم‌افزار جی‌پاور<sup>۱</sup> براساس روش آماری تحلیل واریانس (اثرات اصلی و تعاملی)، اندازه اثر بزرگ یا قوی، میزان  $\alpha$  معادل  $0/05$  و توان آماری  $0/70$ ، برای پنج گروه، ۲۵ سر موش در نظر گرفته شد. تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌های صحرایی براساس دستورالعمل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی هلسینکی ۱۹۶۴ و کد اخلاق اخذ شده از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج (با شماره شناسه IR.IAU.K.REC.1403.65) انجام شد.

**روش اجرای پژوهش:** موش‌های صحرایی پس از دو هفته سازگاری با محیط جدید، به طور تصادفی به پنج گروه سالم، چاق، چاق+مکمل، چاق+ورزش، چاق+مکمل+ورزش تقسیم شدند. گروه‌های چاق به مدت ۱۲ هفته با رژیم غذایی پر چرب و کلسترول دچار بیماری شدند؛ گروه سالم با رژیم غذایی استاندارد تغذیه شد. با توجه به عناصر تشکیل‌دهنده غذای استاندارد جوندگان، غذای پرچرب مورد استفاده برای القای کبد چرب شامل غذای پایه جوندگان (استاندارد) به همراه ۱۵ درصد چربی حیوانی، چهار درصد کلسترول (شرکت سیگما<sup>۲</sup>-آمریکا) و یک درصد اسید کولیک (شرکت سیگما-آمریکا) بود که توسط شرکت بافت و ژن پاسارگاد، روزانه تهیه گردید و به صورت آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت (۲۳). برای اطمینان از القای چاقی در گروه‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب، پس از پایان دوره تغذیه و قبل از شروع مداخلات اصلی پژوهش، نمونه‌های خونی از نوک دم موش‌ها گرفته شد. سپس سطوح گلوکز و نیمرخ چربی (TG، TC، LDL-C و لیپوپروتئین کلسترول با چگالی بالا<sup>۳</sup> (HDL-C) مورد ارزیابی قرار گرفتند. افزایش سطح این شاخص‌ها، تاییدی بر ابتلای به چاقی

در حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها وجود دارد، شناخته می‌شود. بتائین به‌طور درون‌زا از طریق متابولیسم کولین سنتز می‌شود و یا به صورت برون‌زا، از طریق دریافت غذایی دریافت می‌شود (۱۶). به‌تازگی، اثرات بتائین و کولین بر عوامل خطر چاقی و NAFLD مورد مطالعه قرار گرفته است. در این راستا، نشان داده شده است که مکمل‌یاری با کولین و بتائین می‌تواند از طریق کاهش سطوح TG کبدی و خون و تحریک لیپولیز، استئاتوز کبدی را کاهش دهد (۱۷). در همین زمینه، نتایج یک مطالعه سیستماتیک نشان داد که مکمل‌یاری با بتائین می‌تواند در کاهش توده چربی کل بدن و درصد چربی تاثیر معنی‌داری داشته باشد (۱۸). علاوه بر این، مطالعات جدید، بتائین را به عنوان یک اهداکننده متیل و دارای خواص ضدالتهابی و ضداکسایشی معرفی کرده‌اند (۱۹، ۲۰). گزارش شده است مکمل‌یاری با بتائین در موش‌های مدل سمیت کلیوی، سطوح افزایش یافته کراتینین، اوره، شاخص‌های اکسایشی و بیان پروتئین NF- $\kappa$ B را کاهش می‌دهد (۲۱). با این حال، برخی از مطالعات نشان می‌دهند که شواهد برای اثرات ضدالتهابی بتائین قطعی نیست و نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد (۲۲).

از آنجا که شواهد موجود از اثرات مثبت تمرین هوازی بر بهبود متابولیسم کبدی چربی و وضعیت التهابی کبد حمایت می‌کنند (۱۳، ۱۴) و از طرفی نقش بالقوه بتائین در کاهش توده چربی و اثر ضدالتهابی آن به‌تازگی مطرح شده است (۱۸، ۲۱)، به نظر می‌رسد که مداخله همزمان ورزش هوازی و مکمل‌یاری بتائین، احتمالاً از طریق اثرات ضدالتهابی و تاثیر بر شاخص‌های مرتبط با آن، به‌ویژه CD28، در بهبود چاقی و اختلالات متابولیک ناشی از آن از جمله NAFLD نقش موثر داشته باشد. از آنجا که تاکنون اثر تعاملی ورزش هوازی به همراه بتائین بر شاخص‌های مذکور در زمینه چاقی مورد مطالعه قرار نگرفته است و یافته‌های متناقض در خصوص اثر مستقل این مداخلات پژوهشی وجود دارد، هدف این پژوهش بررسی تأثیر همزمان تمرین تناوبی با شدت متوسط به همراه مکمل بتائین نانومولسیفیه بر بیان ژن التهابی CD28 در سلول‌های هیپاتوسیتی، سطوح سرمی اوره، کراتینین و نیمرخ چربی

موش ديگر، به عنوان گروه پايلوت براي اندازه‌گيري حداکثر سرعت دويدن روی نوارگردان انتخاب شده و آزمون عملکرد ورزشی را با سرعت ۱۰ متر بر دقيقه و شيب صفر درجه اجرا کردند. سرعت نوارگردان به ازای هر دو دقيقه، دو متر بر دقيقه افزايش می‌يافت تا موش‌ها قادر به دويدن نباشند (واماندگی). پس از برآورد حداکثر سرعت، گروه‌های تمرینی، برنامه تمرین هوازی تناوبی را مطابق با پروتکل لی<sup>۱</sup> و ديگران (۲۰۲۲) به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته اجرا نمودند (۲۴) (جدول یک).

بود. هم‌چنين وزن موش‌های تغذيه شده با رژيم غذایی پرچرب، پس از ۱۲ هفته مدل‌سازی، به میانگین  $420 \pm 30$  گرم رسيد.

**نحوه اجرای تمرین تناوبی:** موش‌های گروه‌های تمرینی (پیش از القای چاقی)، با هدف آشنایی با پروتکل تمرین تناوبی به مدت دو هفته (سه جلسه در هفته) با سرعت هشت متر در دقيقه، روی نوارگردان دويدند. روز قبل از تمرین تناوبی، پروتکل به صورت پايلوت، روی پنج سر موش، برای برآورد حداکثر اکسیژن مصرفی<sup>۱</sup> ( $VO_2 \max$ ) مناسب پروتکل تمرینی انجام شد. هم‌چنين، پنج سر

جدول ۱. برنامه پروتکل تمرین تناوبی در گروه‌های تمرینی

هفته‌ها	مجموع بدنه اصلی تمرین	استراحت بین ست‌ها	تعداد ست‌های تمرین	شدت تمرین ( $VO_2 \max$ )	سرعت تمرین (متر/دقيقه)	مجموع زمان گرم کردن و سرد کردن
اول	۳۰ دقيقه	۲ دقيقه (با سرعت ۵ متر در دقيقه)	۱۰ ست یک دقيقه‌ای	۵۰ درصد	۱۰	۱۰ دقيقه (با سرعت ۵ متر در دقيقه)
دوم				۶۰ درصد	۱۲	
سوم				۷۰ درصد	۱۴	
چهارم تا هشتم				۸۰ درصد	۱۶	

سرمی و فراهمی زیستی نانومولسیون را افزایش می‌دهد. نانومولسیون‌های تولید شده از طریق فراصوت حساسیت کمتری نسبت به مواردی مانند لخته‌سازی و ادغام دارند و از پایداری طولانی‌مدت فرمول اطمینان می‌دهند (۲۷). برای این منظور، غلظت‌های مختلف بتائین و سورفکتانت<sup>۳</sup> آب دوست (تووین ۸۰) با سورفکتانت چربی دوست (اسپن ۸۰)<sup>۴</sup> به عنوان سورفکتانت مخلوط شدند. ترکیب بتائین و سورفکتانت روی صفحه با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۱۰ دقيقه مخلوط شد. سپس محلول در ابتدا با استفاده از هم‌زنایزر پرسرعت (مدل سایلنت کروشر ام، هیدولف آلمان)<sup>۵</sup>، با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقيقه، به مدت ۲۰ دقيقه مخلوط و همگن شد. پس از آن، سونیکاسیون<sup>۷</sup> به مدت سه دقيقه با حداکثر سرعت انجام شد. نانومولسیون‌های تهیه شده دارای ساختار شفاف بودند. تمام فرمولاسیون‌های آماده شده تا پنج ماه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و دمای یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. هیچ تغییری در اندازه ذرات و شاخص پراکندگی چندگانه<sup>۸</sup> (PDI) مشاهده نشد که پایداری طولانی مدت نانومولسیون‌ها و دوره نگهداری مشخص شده

**نحوه مکمل‌دهی:** موش‌ها در گروه‌های چاق+مکمل و گروه چاق+مکمل+ورزش، مکمل بتائین (شرکت سیگما، امریکا، کد: B3501) را پس از نانومولسیفیه‌سازی، به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته مشابه با روزهای تمرینی، به‌صورت گاوژ دریافت کردند (۲۵). هدف از نانومولسیون‌سازی بتائین در این تحقیق، در درجه اول افزایش فراهمی‌زیستی و کارایی این ترکیب بود که برای دستیابی به غلظت‌های درمانی موثر در مدل‌های حیوانی بسیار مهم است. بتائین نانومولسیون‌شده می‌تواند منجر به جذب بهتر روده‌ای و کاهش استرس اکسیداتیو در حیوانات دارای اختلالات متابولیک گردد (۱۶). هم‌چنين، گزارش شده است بتائین نانومولسیون‌شده، پتانسیل بالقوه‌ای در کاهش آسیب کبد و بهبود سلامت متابولیک دارد و به عنوان ابزاری ارزشمند در مطالعات تجربی مطرح است (۲۶). از روش فراصوت با دامنه بالا برای تهیه نانومولسیون بتائین استفاده شد. زیرا این روش نیروهای برشی بالایی ایجاد می‌کند که منجر به تشکیل ذرات کوچک‌تر (معمولاً در محدوده ۲۰۰-۲۰ نانومتر) می‌شود و پایداری

1. Maximal oxygen consumption

2. Li

3. Surfactant

4. Tween 80

5. Span80

6. Silent Crusher M, Heidolph, Germany

7. Sonication

8. Polydispersity Index

پرایمرها توسط نرم‌افزار کامپیوتری AlleID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST<sup>۱</sup> (بازار پایه تطابق محلی توالی‌ها) جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز<sup>۲</sup> (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

**روش‌های تحلیل آماری:** اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، از طریق نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ در سطح معنی‌داری  $p \leq 0.05$  پردازش و تحلیل شدند و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان گردیدند. ابتدا طبیعی بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون شاپیرو-ویلک<sup>۳</sup> مورد بررسی قرار گرفت؛ سپس جهت تعیین تفاوت بین گروهی (کنترل سالم با کنترل چاق) و بررسی پیش‌فرض، از آزمون آماری t مستقل استفاده شد. برای بررسی تاثیر تعاملی مکمل بتائین نانومولسلیفیه با تمرین هوازی تناوبی بر سطوح CD28، اوره، کراتینین، TC، TG، LDL-C و HDL-C نیز از آزمون تحلیل واریانس دو عاملی و آزمون تعقیبی بونفرونی<sup>۴</sup> استفاده گردید.

#### یافته‌ها

داده‌های توصیفی شاخص‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر در جدول دو نشان داده شده است. نتایج آزمون t مستقل در مورد بررسی تفاوت‌های بین گروهی نشان داد که در گروه کنترل چاق در مقایسه با گروه کنترل سالم، بیان نسبی ژن CD28، سطوح کراتینین، TC، TG، LDL-C ( $p=0.001$ ) و اوره ( $p=0.02$ ) به‌طور معنی‌داری افزایش و سطح HDL-C ( $p=0.0001$ ) کاهش معنی‌دار یافته است (جدول سه).

نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در مورد بررسی اثر تعاملی تمرین و مکمل بر تغییرات شاخص‌های مورد مطالعه نشان داد که اثر ساده تمرین بر بیان نسبی ژن CD28 ( $p=0.001$ )،  $p=0.070$  = اندازه اثر،  $p=0.001$  = اختلاف میانگین‌ها، سطوح کراتینین ( $p=0.001$ )،  $p=0.088$  = اندازه اثر،  $p=0.082$  = اختلاف میانگین‌ها، اوره ( $p=0.04$ )،  $p=0.022$  = اندازه اثر،  $p=0.040$  = اختلاف میانگین‌ها، TC ( $p=0.001$ )،  $p=0.079$  = اندازه اثر،  $p=0.020$  = اختلاف میانگین‌ها، TG ( $p=0.001$ )،  $p=0.064$  = اندازه اثر،  $p=0.001$  = اختلاف میانگین‌ها، LDL-C ( $p=0.001$ )،

در دمای اتاق و یخچال را تایید می‌کند (۲۸).  
**روش‌های سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی:** برای از بین بردن اثرات حاد تمرین، ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی و گاواژ مکمل، حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین (مقدار ۸۰ به ۱۰ میلی‌گرم کتامین به زایلازین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. پس از اطمینان از بی‌هوشی حیوانات، قفسه سینه شکافته شده و ۱۰ میلی‌لیتر خون مستقیم از قلب موش‌ها گرفته شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آن‌ها جدا گردید و بلافاصله برای نگهداری، در دمای ۸۰- سانتی‌گراد، به فریزر انتقال داده شد. اندازه‌گیری میزان سرمی اوره با استفاده از کیت الیزا شرکت مای بایوسورس<sup>۱</sup> (شماره کاتالوگ: MBS2602062) و با حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و میزان کراتینین با استفاده از کیت الیزا شرکت مای بایوسورس (شماره کاتالوگ: A73987) و با حساسیت ۰/۰۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بر اساس دستورالعمل سازنده انجام شد. همچنین اندازه‌گیری سطوح TC، LDL-C، HDL-C و TG در سرم با روش آنزیماتیک<sup>۲</sup>، با کیت‌های اختصاصی شرکت پارس آزمون با حساسیت یک میلی‌گرم در دسی‌لیتر و دستگاه اتوآنالیزور<sup>۳</sup> انجام گرفت.

**بافت‌برداری کبد و سنجش بیان ژن CD28:** برداشت بافت کبدی بلافاصله پس از بی‌هوشی و خون‌گیری انجام شد. بافت نمونه هر حیوان بلافاصله در میکروتیوب وارد محلول نیتروژن مایع شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، فریز گردید. نمونه در آزمایشگاه تا زمان انجام آزمایشات ارزیابی مقدار تغییرات بیان ژن CD28 در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بیان ژن CD28، با روش سیستم‌های زیستی کاربردی، دستگاه‌های تشخیص توالی پرایمرها (Re- al-Time PCR) مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA به صورت RNX-Pluse<sup>۴</sup> (یک معرف تجاری برای استخراج RNA) و به منظور بررسی کیفیت و کمیت آن، از روش اسپکتروفتومتری<sup>۵</sup> و الکتروفوروز روی ژل آگارز استفاده گردید. ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن CD28 با استفاده از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری<sup>۶</sup> (NCBI) استخراج شد.

1. ELISA kit, MyBioSource, Catalog #

MBS2602062

2. Enzymatic method

3. Auto analyzer

4. A commercial reagent for RNA extraction

5. Spectrophotometry

6. National center for biotechnology information

7. Basic local alignment search tool

8. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

9. Shapiro-Wilk

10. Bonferroni

جدول ۲. توصیف شاخص‌های مورد مطالعه در پژوهش پس از مداخله

گروه‌ها	سالم	چاق	چاق+تمرین	چاق+مکمل	چاق+مکمل+تمرین
CD28 (بیان نسبی)	۰/۲۵ ± ۰/۰۴	۱/۰۲ ± ۰/۱۲	۰/۵۴ ± ۰/۱۸	۰/۵۰ ± ۰/۰۵	۰/۲۴ ± ۰/۰۳
اوره (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۹ ± ۱/۵۸	۲۲/۸۰ ± ۲/۵۸	۱۹/۱۰ ± ۱/۵۹	۲۲/۱۰ ± ۱/۵۱	۱۹/۷۰ ± ۱/۰۹
کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱/۵۸ ± ۰/۱۹	۲/۵۸ ± ۰/۲۵	۱/۵۹ ± ۰/۱۶	۱/۵۱ ± ۰/۱۸	۱/۰۹ ± ۰/۱۷
کلسترول تام (میلی گرم بر دسی لیتر)	۹۳ ± ۶/۵۰	۲۸۱/۶۰ ± ۱۴/۴۰	۱۸۱/۶۰ ± ۸/۱۰	۲۰۹/۲۰ ± ۹/۸۸	۱۵۹ ± ۶/۵۰
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۶۶/۴۰ ± ۵/۳۰	۱۲۸/۶۰ ± ۲/۷۰	۱۰۳/۸۰ ± ۳/۱۰	۱۰۴/۴۰ ± ۲/۴۰	۸۶/۶۰ ± ۹/۳۰
HDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	۴۶/۲۰ ± ۴/۰۸	۱۹/۸۰ ± ۲/۲۰	۲۴ ± ۳/۸۰	۳۰ ± ۴/۱۰	۳۸/۴۰ ± ۸/۰۱
LDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	۹۶/۹۰ ± ۸/۱۰	۲۳۶/۱۰ ± ۱۷/۶۰	۱۳۸/۷۰ ± ۱۲/۳۰	۱۶۰/۶۴ ± ۱۳/۸۰	۱۰۱ ± ۳/۴۰

CD28: مجموعه تمایزی شماره ۲۸؛ HDL-C: لیپوپروتئین کلسترول با چگالی بالا؛ LDL-C: لیپوپروتئین کلسترول با چگالی پائین.

جدول ۳. نتایج آزمون t مستقل در مورد مقایسه شاخص‌های پژوهش بین دو گروه کنترل سالم و کنترل چاق

متغیر	درجه آزادی	t	p
CD28 (بیان نسبی)	۸	-۱۲/۵۲	۰/۰۰۱*
اوره (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸	-۲/۸۰	۰/۰۲*
کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸	-۲۲/۳۶	۰/۰۰۱*
کلسترول تام (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸	-۲۶/۰۶	۰/۰۰۱*
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸	-۲۳/۳۱	۰/۰۰۱*
HDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸	۱۲/۶۱	۰/۰۰۱*
LDL-C (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸	-۲۱/۸۷	۰/۰۰۱*

\* نشانه تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل سالم در سطح  $p \leq ۰/۰۵$ . CD28: مجموعه تمایزی شماره ۲۸؛ HDL-C: لیپوپروتئین کلسترول با چگالی بالا؛ LDL-C: لیپوپروتئین کلسترول با چگالی پائین.

افزایش HDL-C می‌شود. در تأیید این یافته‌ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان داد که بیان نسبی ژن CD28، سطوح کراتینین، اوره، TC، TG و LDL-C در نمونه‌هایی که مداخله همزمان تمرین و مکمل دریافت نمودند، در قیاس با نمونه‌هایی که مداخله مکمل تنها را دریافت کردند،

اندازه اثر،  $-۵۹/۶۴ =$  اختلاف میانگین‌ها) و HDL-C در  $(p = ۰/۰۱)$ ،  $۰/۳۰ =$  اندازه اثر،  $۸/۴۰ =$  اختلاف میانگین‌ها) در سطح دریافت مکمل معنی‌دار است. در واقع، تمرین در صورت دریافت مکمل، منجر به کاهش معنی‌دار بیان نسبی ژن CD28، سطوح کراتینین، اوره، TC، TG و LDL-C و

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در مورد مقایسه متغیرهای وابسته تحقیق

متغیرها	منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	F	P	ضریب اتاء
بیان نسبی CD28 (mRNA)	تمرین	۰/۶۷	۱	۴۹/۶۵	۰/۰۰۰۱*	۰/۷۵
	مکمل	۰/۸۲	۱	۶۱/۱۱	۰/۰۰۰۱**	۰/۷۹
	تمرین×مکمل	۰/۰۶	۱	۴/۸۴	۰/۰۴***	۰/۲۳
	خطا	۰/۲۱	۱۶			
اوره	تمرین	۴۶/۵۱	۱	۱۴/۵۹	۰/۰۰۲*	۰/۴۷
	مکمل	۰/۰۱	۱	۰/۰۰۴	۰/۹۵	۰/۰۰
	تمرین×مکمل	۲/۱۱	۱	۰/۶۶	۰/۴۲	۰/۰۴
	خطا	۵۱	۱۶			
کراتینین	تمرین	۷/۰۴	۱	۴۹۶/۱۱	۰/۰۰۰۱*	۰/۹۶
	مکمل	۰/۴۲	۱	۳۰/۲۲	۰/۰۰۰۱**	۰/۶۵
	تمرین×مکمل	۰/۶۸	۱	۴۸/۴۶	۰/۰۰۰۱***	۰/۷۵
	خطا	۰/۲۲	۱۶			

نشانه اثر معنی دار تمرین هوازی تناوبی بر شاخص‌های تحقیق در سطح  $p \leq 0.05$ : \*\* نشانه اثر معنی دار مکمل بتائین نانومولسیفیه بر شاخص‌های تحقیق. \*\*\* نشانه اثر تعاملی معنی دار تمرین هوازی تناوبی همراه با مکمل بتائین نانومولسیفیه بر شاخص‌های تحقیق. CD28: مجموعه تمایزی شماره ۲۸.

جدول ۵. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در مورد مقایسه متغیرهای نمیرخ لیپیدی

متغیرها	منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	آماره F	سطح معنی داری	ضریب اتاء
کلسترول تام	تمرین	۲۸۲۰۰/۰۵	۱	۲۷۱/۹۰	۰/۰۰۰۱*	۰/۹۴
	مکمل	۱۱۲۸۱/۲۰	۱	۱۰۸/۷۸	۰/۰۰۰۱**	۰/۸۷
	تمرین×مکمل	۳۱۰۰/۰۵	۱	۲۹/۸۹	۰/۰۰۰۱***	۰/۶۵
	خطا	۱۶۵۹/۲۰	۱۶			
تری گلیسرید	تمرین	۲۲۶۸/۴۰	۱	۸۲/۰۴	۰/۰۰۰۱*	۰/۸۳
	مکمل	۲۱۴۲/۴۰	۱	۷۷/۴۰	۰/۰۰۰۱**	۰/۸۲
	تمرین×مکمل	۶۱/۲۵	۱	۲/۲۱	۰/۱۵	۰/۱۲
	خطا	۴۴۲/۴۰	۱۶			
HDL-C	تمرین	۱۹۸/۴۰	۱	۷/۸۲	۰/۰۱*	۰/۳۲
	مکمل	۷۵۶/۴۰	۱	۲۹/۸۰	۰/۰۰۰۱**	۰/۶۵
	تمرین×مکمل	۲۲/۰۵	۱	۰/۸۶۹	۰/۳۶	۰/۰۵
	خطا	۴۰۶	۱۶			
LDL-C	تمرین	۳۰۸۲۶/۹۰	۱	۱۸۵/۳۷	۰/۰۰۰۱*	۰/۹۲
	مکمل	۱۶۰۴۰/۴۰	۱	۹۶/۴۵	۰/۰۰۰۱**	۰/۸۵
	تمرین×مکمل	۱۷۸۲/۲۰	۱	۱۰/۷۱	۰/۰۰۵***	۰/۴۰
	خطا	۲۶۶۰/۷۰	۱۶			

\* نشانه اثر معنی دار تمرین هوازی تناوبی بر شاخص‌های تحقیق در سطح  $p \leq 0.05$ : \*\* نشانه اثر معنی دار مکمل بتائین نانومولسیفیه بر شاخص‌های تحقیق. \*\*\* نشانه اثر تعاملی معنی دار تمرین هوازی تناوبی همراه با مکمل بتائین نانومولسیفیه بر شاخص‌های تحقیق. HDL-C: لیپوپروتئین کلسترول با چگالی بالا؛ LDL-C: لیپوپروتئین کلسترول با چگالی پایین.

نمونه‌های با مداخله تمرین تنها، پایین‌تر، و سطح HDL-C آن‌ها بالاتر است.

علاوه بر این، اثر ساده مکمل بر بیان نسبی ژن CD28 ( $p=0/001$ )، اندازه اثر،  $0/91$ ، اختلاف میانگین‌ها، سطوح کراتینین ( $p=0/001$ )،  $0/96$ ، اندازه اثر،  $1/55$ ، اختلاف میانگین‌ها، اوره ( $p=0/005$ )،  $0/40$ ، اندازه اثر،  $3/70$ ، اختلاف میانگین‌ها، TC ( $p=0/001$ )،  $0/94$ ، اندازه اثر،  $100/00$ ، اختلاف میانگین‌ها، TG ( $p=0/001$ )،  $0/77$ ، اندازه اثر،  $24/80$ ، اختلاف میانگین‌ها و LDL-C ( $p=0/001$ )،  $0/89$ ، اندازه اثر،  $97/40$ ، اختلاف میانگین‌ها) در سطح بدون مکمل نیز معنی‌دار، اما بر سطح HDL-C ( $p=0/20$ )،  $0/10$ ، اندازه اثر،  $4/200$ ، اختلاف میانگین‌ها، غیر معنی‌دار بود. در واقع، تمرین در حالت بدون مکمل، منجر به کاهش معنی‌دار بیان نسبی ژن CD28، سطوح کراتینین، اوره، TC، TG و LDL-C شد؛ اما تغییر معنی‌داری در سطح HDL-C ایجاد نکرد. در تأیید این یافته‌ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان داد که بیان نسبی ژن CD28، سطوح کراتینین، اوره، TC، TG و LDL-C در نمونه‌هایی که مداخله تمرین تنها را دریافت نمودند در قیاس با نمونه‌های بدون مداخله تمرینی و مکمل، پایین‌تر است.

#### بحث

طبق یافته‌های پژوهش حاضر، ابتلا به چاقی در موش‌ها با افزایش سطوح CD28، اوره، کراتینین، TC، TG و LDL-C و کاهش سطح HDL-C همراه بود. این نتایج، با یافته‌های برخی مطالعات پیشین همسو است (۳-۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمرین هوازی تناوبی و مکمل بتائین نانومولسیفیه هر کدام به تنهایی سطوح TG، TC، LDL-C را کاهش و HDL-C را افزایش دادند. هم‌راستا با این یافته‌ها، در یک مطالعه گزارش شد یک دوره تمرین هوازی با شدت‌های مختلف در موش‌های مبتلا به NAFLD، منجر به بهبود معنی‌دار نیمرخ چربی خون (TG، TC و LDL-C) و وضعیت مورفولوژیک کبد به ویژه در گروهی گردید که با شدت متوسط تمرین کرده بودند (۱۳). در تحقیق دیگری در سال ۲۰۱۹، گزارش شد که یک دوره تمرین هوازی در موش‌های چاق، منجر به کاهش معنی‌دار TC، LDL-C، TG، گلوکز، انسولین و افزایش HDL-C می‌گردد (۲۹). متناقض با مطالعات فوق، در مطالعه دیگری گزارش شده شدت‌های مختلف ورزش

پایین‌تر و سطح HDL-C در همین نمونه‌ها، بالاتر است. همچنین، اثر ساده تمرین بر بیان نسبی ژن CD28 ( $p=0/001$ )، اندازه اثر،  $0/91$ ، اختلاف میانگین‌ها، سطوح کراتینین ( $p=0/001$ )،  $0/96$ ، اندازه اثر،  $1/55$ ، اختلاف میانگین‌ها، اوره ( $p=0/005$ )،  $0/40$ ، اندازه اثر،  $3/70$ ، اختلاف میانگین‌ها، TC ( $p=0/001$ )،  $0/94$ ، اندازه اثر،  $100/00$ ، اختلاف میانگین‌ها، TG ( $p=0/001$ )،  $0/77$ ، اندازه اثر،  $24/80$ ، اختلاف میانگین‌ها و LDL-C ( $p=0/001$ )،  $0/89$ ، اندازه اثر،  $97/40$ ، اختلاف میانگین‌ها) در سطح بدون مکمل نیز معنی‌دار، اما بر سطح HDL-C ( $p=0/20$ )،  $0/10$ ، اندازه اثر،  $4/200$ ، اختلاف میانگین‌ها، غیر معنی‌دار بود. در واقع، تمرین در حالت بدون مکمل، منجر به کاهش معنی‌دار بیان نسبی ژن CD28، سطوح کراتینین، اوره، TC، TG و LDL-C شد؛ اما تغییر معنی‌داری در سطح HDL-C ایجاد نکرد. در تأیید این یافته‌ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان داد که بیان نسبی ژن CD28، سطوح کراتینین، اوره، TC، TG و LDL-C در نمونه‌هایی که مداخله تمرین تنها را دریافت نمودند در قیاس با نمونه‌های بدون مداخله تمرینی و مکمل، پایین‌تر است.

همچنین نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در مورد بررسی اثر تعاملی تمرین و مکمل بر تغییرات شاخص‌های مورد مطالعه نشان داد که اثر ساده مکمل بر بیان نسبی ژن CD28 ( $p=0/001$ )،  $0/69$ ، اندازه اثر،  $0/24$ ، اختلاف میانگین‌ها، سطوح TC ( $p=0/003$ )،  $0/43$ ، اندازه اثر،  $22/60$ ، اختلاف میانگین‌ها، TG ( $p=0/001$ )،  $0/62$ ، اندازه اثر،  $17/20$ ، اختلاف میانگین‌ها، LDL-C ( $p=0/001$ )،  $0/57$ ، اندازه اثر،  $37/76$ ، اختلاف میانگین‌ها و HDL-C ( $p=0/001$ )،  $0/56$ ، اندازه اثر،  $14/40$ ، اختلاف میانگین‌ها) در سطح تمرین کرده معنی‌دار است؛ اما در سطوح کراتینین ( $p=0/31$ )،  $0/06$ ، اندازه اثر،  $0/07$ ، اختلاف میانگین‌ها و اوره ( $p=0/60$ )،  $0/01$ ، اندازه اثر،  $0/60$ ، اختلاف میانگین‌ها) معنی‌دار نیست. در واقع، مکمل در حالت تمرین‌کرده، منجر به کاهش معنی‌دار بیان نسبی ژن CD28، سطوح TC، TG، LDL-C و افزایش HDL-C شد؛ اما تغییر معنی‌داری در سطوح کراتینین و اوره ایجاد نکرد. در تأیید این یافته‌ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان داد که بیان نسبی ژن CD28، سطوح TC، TG و LDL-C در نمونه‌هایی که مداخله همزمان تمرین و مکمل دریافت نمودند، در قیاس با

دوز بالایی از بتائین در آزمودنی‌های چاق، تغییر معنی‌داری در وزن، توده چربی و ترکیب بدنی ایجاد نکرد (۱۹). به نظر می‌رسد عدم کنترل دقیق رژیم غذایی آزمودنی‌ها در این مطالعه، از دلایل احتمالی عدم تغییر معنی‌دار نتایج باشد. همچنین، یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد تمرین هوازی تناوبی و مکمل بتائین نانومولسیفیه هر کدام به تنهایی، سبب کاهش سطوح CD28 می‌گردند. همسو با مطالعه حاضر، در پژوهشی سیستماتیک گزارش شده تمرین هوازی اثر معنی‌داری بر کاهش سطوح پروتئین واکنش‌گر C<sup>۶</sup> (CRP) و توده چربی در بزرگسالان مبتلا به چاقی و اضافه وزن دارد. به نظر می‌رسد کاهش توده چربی پس از تمرین هوازی، رهایش سایتوکاین‌های التهابی از بافت آدیپوز را کاهش می‌دهد و این موضوع علاوه بر تاثیر مثبت بر کاهش مقاومت به انسولین، احتمالاً در کاهش CD28 التهابی نیز موثر است (۳۲). علاوه بر این، در مطالعه دیگری گزارش شده دریافت دوزهای فیزیولوژیک مناسب بتائین، بیان سایتوکاین‌های التهابی در سلول‌های چربی انسانی قرار گرفته در معرض هاپوکسی را کاهش می‌دهد (۳۳). همچنین در مطالعات جدید، بتائین، به عنوان یک اهداکننده متیل و دارای خواص ضدالتهابی و ضداکسایشی معرفی شده است (۲۰). به نظر می‌رسد مکانیزم اثر احتمالی بتائین در تغییرات شاخص‌های مورد مطالعه، به فواید ضدالتهابی آن مرتبط باشد. این مکانیسم‌ها شامل تنظیم مسیریهای التهابی و تغییرات اپیژنتیکی است که به اثرات ضدالتهابی بتائین کمک می‌کند. شواهد موجود نشان می‌دهند که بتائین، عامل NF-kB و متعاقباً، رهایش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را مهار می‌کند (۳۴). همچنین بتائین، ژن اینفلامازوم پروتئین-۳ حاوی دامنه پایرین و NOD-LRR<sup>۷</sup> (NLRP3) را کاهش می‌دهد که یک عامل کلیدی در التهاب مزمن مرتبط با چاقی است (۳۴). دیگر یافته پژوهش حاضر نشان داد که تمرین هوازی تناوبی و مکمل بتائین نانومولسیفیه هر کدام به تنهایی سطوح کراتینین را کاهش دادند، ولی تنها اثر تمرین بر کاهش اوره معنی‌دار بود. همسو با این یافته‌ها، نتایج یک مطالعه نشان داده هشت هفته تمرین هوازی با شدت متوسط در موش‌های چاق دیابتی، باعث کاهش معنی‌دار

هوازی دوچرخه‌سواری، سبب تغییرات معنی‌دار در ترکیب بدن و نیمرخ چربی زنان میانسال چاق نمی‌شود (۱۵). به نظر می‌رسد بهبود نیمرخ لیپیدی در درجه نخست، به افزایش متابولیسم چربی، ایجاد تغییرات مثبت در عملکرد میتوکندری و کاهش مقاومت انسولینی نسبت داده شود. تمرینات هوازی (به ویژه با شدت متوسط) استفاده از TGهای عضلانی را افزایش می‌دهد و منجر به بهبود اکسیداسیون چربی می‌شود. این شیوه تمرینی، همچنین با افزایش لیپولیز بافت آدیپوز باعث افزایش دسترسی اسیدهای چرب خون به بافت عضلانی می‌شود و برای مصرف انرژی در ساعات پس از ورزش و کاهش کلی توده چربی بسیار مهم است. در واقع، تمرینات هوازی با شدت متوسط، بیان همولوگ-۲ حامل میتوکندری<sup>۱</sup> (MTCH2) که در تنظیم متابولیسم چربی در بافت چربی نقش دارد را افزایش می‌دهند. افزایش تقاضای انرژی ناشی از ورزش، منجر به سازگاری در عملکرد میتوکندری و کاتابولیسم چربی می‌شود (۳۰). از طرفی، کاهش توده چربی به واسطه ورزش، با کاهش مقاومت انسولینی، نیمرخ چربی خون و کاهش تجمع چربی در کبد همراه است (۲۹). علاوه بر این، همسو با اثرات مکمل بتائین نانومولسیفیه در کاهش نیمرخ چربی در پژوهش حاضر، نتایج یک مطالعه نشان داد مکمل‌یاری با بتائین، از طریق کاهش سطوح TG کبدی و خون، تحریک لیپولیز می‌تواند تجمع چربی در کبد را در نمونه‌های چاق کاهش دهد (۱۷). تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که بتائین از طریق مکانیسم‌های اپیژنتیکی بر بیان ژن‌ها تاثیر می‌گذارد؛ به‌ویژه از طریق تنظیم افزایشی ژن بتائین-هموسیستئین S-متیل ترانسفراز<sup>۲</sup> (BHMT) که در متابولیسم چربی‌ها و فرآیندهای التهابی نقش دارد. بتائین با افزایش بیان BHMT، افزایش سطح نیکوتین امید آدنین دی نوکلئوتید فسفات<sup>۳</sup> (NADPH) و همچنین افزایش بیان ژن مرتبط با توده چربی و چاقی<sup>۴</sup> (FTO) که تنظیم‌کننده بیان هم‌فعال کننده-یک آلفای گیرنده گامای فعال شده با تکثیرکننده پراکسی زوم<sup>۵</sup> (PGC-1α) است، می‌تواند متابولیسم چربی کبدی را بهبود بخشد و شدت بیماری NFALD را کاهش دهد (۳۱). در تناقض با این یافته‌ها، مطالعه‌ای نشان داده که مکمل‌یاری درازمدت با

1. Mitochondrial carrier homolog 2

2. Betaine-homocysteine s-methyltransferase

3. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

4. Fat mass and obesity associated gene

5. Peroxisome proliferator-activated receptor

gama coactivator 1-alpha

6. C-Reactive Protein

7. NOD- LRR- and pyrin domain-containing protein 3 inflammasome

به تنظیم متابولیسم چربی و کاهش مقاومت انسولینی از طریق بهبود عملکرد میتوکندری نسبت داده می‌شود. شواهد نشان می‌دهند تمرین هوازی به طور قابل توجهی بر مکانیسم‌های درون سلولی به‌ویژه از طریق فعال شدن PGC-1 $\alpha$ ، تأثیر می‌گذارد و سبب کاهش استئاتوز کبدی، التهاب و فیروز در کبد می‌شود (۳۹). ساز و کار احتمالی دیگر در تنظیم بیان PGC-1 $\alpha$  در ورزش، رهایش هیپاتوکاین‌ها از جمله عامل رشد فیروبلاست-21 (FGF21) در پاسخ به تمرینات ورزشی هوازی است که در مدل‌های چاقی، دیابت و NAFLD نیز گزارش شده است. شواهد حاکی از آن است که تجویز FGF21 باعث بهبود نیمرخ متابولیک و کاهش سطح TG کبدی در این مدل‌ها می‌شود (۴۰). از طرفی، شواهد موجود، نشانگر اثرات بتائین بر بهبود عملکرد میتوکندری از طریق مکانیزم‌های مختلف به‌ویژه PGC-1 $\alpha$  هستند. پژوهش‌ها تنظیم افزایشی بیان PGC-1 $\alpha$  توسط بتائین را در موش‌های db/db و موش‌های دریافت‌کننده الکل نشان داده‌اند (۴۱). بیان شده است که افزایش میتوژنز توسط بتائین از طریق فعالسازی مسیر PGC-1 $\alpha$ /سیرتوئین-1 (SIRT1) انجام می‌شود. در یک مطالعه گزارش شده مکمل‌یاری بتائین، با افزایش مقدار پروتئین میتوکندری و محتوای آدنوزین تری فسفات (ATP)، افزایش mRNA و سطوح پروتئین PGC-1 $\alpha$ ، عامل تنفسی هسته‌ای-یک (NRF1)، عامل رونویسی میتوکندریایی TFAM<sup>5</sup> و پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات<sup>6</sup> (AMPK) در سلول‌های عضلانی تمایز یافته<sup>7</sup> C2C12 همراه است (۴۳). در نتیجه، به نظر می‌رسد تعامل تمرین هوازی تناوبی و مکمل‌یاری بتائین نانوامولسیفیه، توانایی کافی برای فعالسازی مسیرهای مرتبط با PGC-1 $\alpha$  و بهبود عملکرد میتوکندریایی را داشته باشد. مطالعات گزارش کرده‌اند بهبود عملکرد میتوکندریایی در چاقی از طریق افزایش متابولیسم چربی، تنظیم برداشت سلولی گلوکز و تعدیل مقاومت انسولینی، می‌تواند نقش محوری در کاهش التهاب مزمن مرتبط با چاقی و نشانگرهای آن، کاهش تجمع چربی در بافت آدیپوز و کبد و بهبود نیمرخ چربی خون داشته باشد (۴۳، ۴۴).

مکانیزم‌های ناشی از چاقی که در تغییرات نیمرخ چربی خون مطرح شده‌اند شامل تغییرات در متابولیسم چربی،

سطوح سرمی کراتینین، اوره، TG و فعالیت آنزیم‌های کبدی شد (۱۴). هم‌چنین، در پژوهش دیگری گزارش شده ۱۲ هفته تمرین هوازی به همراه رژیم غذایی در آزمودنی‌های میانسال چاق مبتلا به سندرم متابولیک، باعث کاهش معنی‌دار وزن و سطوح سرمی اوره و کراتینین می‌شود (۳۵). با این حال، در تناقض با این نتایج، مطالعه‌ای که اثرات تمرین مقاومتی را بر نشانگرهای بیوشیمیایی در آزمودنی‌های چاق ساکن در ارتفاعات بالا بررسی کرده است، نشان داد که پس از ۱۲ هفته تمرین، تغییر معنی‌داری در سطوح اوره و کراتینین پلازما مشاهده نشد؛ در حالی که بهبود معنی‌داری در شاخص‌های التهابی و نیمرخ چربی گزارش گردید (۳۶). این عدم تغییر در اوره و کراتینین احتمالاً به شرایط سکونت در ارتفاع نسبت داده می‌شود؛ زیرا شواهد نشان می‌دهد افراد ساکن در ارتفاعات بالا، به دلیل سازگاری‌های فیزیولوژیک در عملکرد کلیه و متابولیسم، سطوح پایین‌تری از اوره و کراتینین را نسبت به افراد ساکن در سطح دریا نشان می‌دهند (۳۷). ساز و کار احتمالی اثر ورزش بر کاهش این شاخص‌های التهابی با کاهش توده چربی مرتبط است. زیرا با کاهش توده چربی و به دنبال آن، کاهش رهایش سایتوکاین‌های التهابی از بافت آدیپوز، مقاومت به انسولین کاهش می‌یابد (۳۲). از سوی دیگر، شواهد نشان می‌دهند که تعدیل التهاب مزمن ناشی از چاقی و توده چربی، با کاهش سطوح اوره و کراتینین در ارتباط است (۳۸). علاوه بر این، در مطالعه‌ای دیگر نتایج نشان داد که مکمل‌یاری با بتائین در موش‌های مدل سمیت کلیوی، منجر به کاهش معنی‌دار سطوح کراتینین، اوره، شاخص‌های اکسایشی و بیان پروتئین NF- $\kappa$ B التهابی می‌شود (۲۱).

یافته دیگر مطالعه حاضر اثر تعاملی معنی‌دار تمرین و مکمل در کاهش LDL-C، TC و کراتینین بود. در همین راستا و همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، نتایج یک مطالعه نشان داد ۱۰ هفته مکمل‌یاری با بتائین (۱/۵ درصد وزن بدن) به همراه تمرین هوازی روی نوارگردان با شدت متوسط در موش‌های چاق، توانست وزن بدن و توده چربی را به طور معنی‌داری کاهش داده و حساسیت انسولینی و تحمل گلوکز را بهبود بخشد (۶). ساز و کار احتمالی اثر فعالیت ورزشی در تعامل با مکمل بتائین بر کاهش توده چربی و التهاب،

1. Fibroblast growth factor 21

2. Sirtuin-1

3. Adenosine triphosphate

4. Nuclear respiratory factor 1

5. Mitochondrial transcription factor A

6. 5' adenosine monophosphate-activated

protein kinase

7. Differentiated muscle cells

متوسط و مکمل یاری بتائین نانوامولسیفیه هر کدام به تنهایی و هم‌چنین در کنار یکدیگر، از طریق تنظیم متابولیسم چربی، احتمالاً نقش مهمی در کاهش التهاب کبدی ناشی از چاقی داشته باشد. هم‌چنین با توجه به یافته‌های این مطالعه، به نظر می‌رسد که تعامل تمرین و مکمل، احتمالاً می‌تواند اثر بیشتری در کاهش التهاب مزمن مرتبط با چاقی از طریق تعدیل مسیرهای التهابی به واسطه کاهش بیان CD28 داشته باشد. از آنجا که این پژوهش به صورت آزمایشگاهی انجام شد، محدودیت خاصی در اجرای پژوهش وجود نداشت؛ با این حال، از جمله محدودیت‌های احتمالی این پژوهش می‌توان به عدم کنترل دقیق تأثیر احتمالی استرس ناشی از شوک دستگاه نوارگردان و عدم سنجش سایر شاخص‌های مرتبط اشاره کرد که نتیجه‌گیری محکم را میسر می‌کند.

#### تعارض منافع

تداخل در منافع وجود ندارد.

#### قدردانی و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایان نامه دکتری تخصصی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج است. هزینه‌های مطالعه بر عهده محقق بوده و نویسنده هم‌چنین از آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد واحد کرج به دلیل همکاری صمیمانه، تشکر می‌کند.

افزایش مقاومت به انسولین و تغییر در بیان ژن‌ها می‌باشند. تغییرات اپی‌ژنتیکی، از جمله متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی، بدون ایجاد تغییر در توالی DNA بر بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم چربی تأثیر می‌گذارند. این تغییرات با اثرگذاری بر ژن‌های دخیل در تجمع و متابولیسم چربی، می‌توانند افراد را مستعد بروز اختلالات چربی کرده و در نهایت به بروز هایپرلیپیدمی در افراد چاق کمک کنند (۴۵). چاقی اغلب با مقاومت به انسولین همراه است که جریان کبدی اسیدهای چرب را افزایش می‌دهد و منجر به افزایش تولید لیپوپروتئین کلسترول با چگالی بسیار کم<sup>۱</sup> (VLDL-C) و اختلال در کاتابولیسم بقایای لیپوپروتئین‌های آتروژنیک می‌شود. مقاومت به انسولین هم‌چنین، منجر به هایپرکاتابولیسم HDL-C می‌شود که می‌تواند دیس‌لیپیدمی<sup>۲</sup> را تشدید نماید (۴۶). علاوه بر این، افزایش مقاومت انسولینی در چاقی را می‌توان از دلایل اصلی افزایش اوره، کراتینین و به طور کلی التهاب مزمن دانست (۵). التهاب مزمن با درجه پایین ناشی از چاقی، با تحریک پاسخ‌های ایمنی و التهابی همراه است و CD28 نقش مهمی در تحریک التهاب درجه پایین در چاقی و در نتیجه، تحریک سنتز سایتوکاین‌های التهابی و تشدید مقاومت انسولینی ناشی از آن دارد (۷).

**نتیجه‌گیری:** مداخله تمرین هوازی تناوبی با شدت

#### منابع

1. Arifah SN, Atho'illah MF, Lukiati B, Lestari SR. Herbal medicine from single clove garlic oil extract ameliorates hepatic steatosis and oxidative status in high fat diet mice. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2020;27(1):46-56. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.1.5>.
2. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1:15080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.80>.
3. Cigri E, Inan FC, Er E, Yildiz E. The relationship between lipid profile and non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescents with obesity. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2022;32(5):591-5. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2022.05.591>.
4. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(4):256-68. <https://doi.org/10.18632/aging.100738>.

1. Very low-density lipoprotein cholesterol

2. Dyslipidemia

5. Ude UA KM, Ogbonna CL, Usanga VU, Azi SO. Evaluation of urea, creatinine levels, and proteinuria among obese individuals within abakaliki metropolis. *Nigerian Journal of Basic and Clinical Sciences*. 2022;19(2):120-5. [https://doi.org/10.4103/njbcs.njbcs\\_74\\_21](https://doi.org/10.4103/njbcs.njbcs_74_21).
6. Yu J, Laybutt DR, Youngson NA, Morris MJ. Concurrent betaine administration enhances exercise-induced improvements to glucose handling in obese mice. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2022;32(10):2439-49. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2022.08.012>.
7. Esensten JH HY, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016;44(5):973-88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>.
8. Marinari B, Costanzo A, Marzano V, Piccolella E, Tuosto L. CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(16):6098-103. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308688101>.
9. Chew NWS, Ng CH, Tan DJH, Kong G, Lin C, Chin YH, et al. The global burden of metabolic disease: Data from 2000 to 2019. *Cell Metabolism*. 2023;35(3):414-28.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.02.003>.
10. Singh S, Osna NA, Kharbada KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World Journal of Gastroenterology*. 2017;23(36):6549-70. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6549>.
11. Wong VW, Singal AK. Emerging medical therapies for non-alcoholic fatty liver disease and for alcoholic hepatitis. *Translational Gastroenterology and Hepatology*. 2019;4:53. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.06.06>.
12. Voudouris D, Horianopoulou M, Apostolopoulou Z, Chryssanthopoulos C, Bardopoulou M, Maridaki M, et al. The effects of a short-term combined exercise program on liver steatosis indices and the lipidemic and glycemic profile in NAFLD individuals: A Pilot Study. *Metabolites*. 2023;13(10). <https://doi.org/10.3390/metabo13101074>.
13. Ruan L, Wang G, Qing Lv Z, Li S, Liu Q, Ren Y, et al. The effect of varied exercise intensity on antioxidant function, aortic endothelial function, and serum lipids in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Investigación Clínica*. 2022;63(4):327-43. <https://doi.org/10.54817/ic.v63n4a01>.
14. Liu HW, Kao HH, Wu CH. Exercise training upregulates SIRT1 to attenuate inflammation and metabolic dysfunction in kidney and liver of diabetic db/db mice. *Nutrition & Metabolism*. 2019;16:22. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0349-4>.
15. Kim D-S, An J-H, Eo K-T. The effects of body composition, blood lipid & lipid metabolism on bicycle exercise of various intensities in obesity middle aged women. *Journal of Industrial Convergence*. 2021;19(1):137-46. <https://doi.org/10.22678/JIC.2021.19.1.137>
16. Eklund M, Bauer E, Wamatu J, Mosenthin R. Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutrition Research Reviews*. 2005;18(1):31-48. <https://doi.org/10.1079/NRR200493>. DOI:10.1079/NRR200493.
17. Sivanesan S, Taylor A, Zhang J, Bakovic M. Betaine and choline improve lipid homeostasis in obesity by participation in mitochondrial oxidative demethylation. *Frontiers in Nutrition*. 2018;5:61. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00061>.
18. Gao X, Zhang H, Guo X-f, Li K, Li S, Li D. Effect of betaine on reducing body fat—a systematic review and meta-

- analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*. 2019;11(10):2480. <https://doi.org/10.3390/nu11102480>.
19. Schwab U, Törrönen A, Toppinen L, Alfthan G, Saarinen M, Aro A, et al. Betaine supplementation decreases plasma homocysteine concentrations but does not affect body weight, body composition, or resting energy expenditure in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(5):961-7. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.5.961>.
20. Alvarenga L, Ferreira MS, Kemp JA, Mafra D. The role of betaine in patients with chronic kidney disease: a narrative review. *Current Nutrition Reports*. 2022;11(3):395-406. <https://doi.org/10.1007/s13668-022-00426-z>.
21. Norouzzadeh M, Kalantar H, Khorsandi L, Mohtadi S, Khodayar MJ. Betaine ameliorates arsenic-induced kidney injury in mice by mitigating oxidative stress-mediated inflammation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2024;758:110076. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110076>.
22. Xu J, Nie Z, Qiu X, Zhang J, Han S. Effects of betaine supplementation on inflammatory markers: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2023;74(7):721-9. <https://doi.org/10.1080/09637486.2023.2257906>.
23. Wang DQ-H, Schmitz F, Kopin AS, Carey MC. Targeted disruption of the murine cholecystokinin-1 receptor promotes intestinal cholesterol absorption and susceptibility to cholesterol cholelithiasis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(4):521-8. <https://doi.org/10.1172/JC116801>.
24. Li J, Huang L, Xiong W, Qian Y, Song M. Aerobic exercise improves non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the protein expression of the CNPY2-PERK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022;603:35-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.008>.
25. Chen W, Zhang X, Xu M, Jiang L, Zhou M, Liu W, et al. Betaine prevented high-fat diet-induced NAFLD by regulating the FGF10/AMPK signaling pathway in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *European Journal of Nutrition*. 2021;60:1655-68. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02362-6>.
26. Rasineni K, Lee SM, McVicker BL, Osna NA, Casey CA, Kharbada KK. Susceptibility of asialoglycoprotein receptor-deficient mice to Ips/galactosamine liver injury and protection by betaine administration. *Biology*. 2020;10(1):19. <https://doi.org/10.3390/biology10010019>.
27. Koroleva MY, Yurtov EV. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*. 2012;81(1):21. <https://doi.org/10.1070/RC2012v081n01ABEH004219>.
28. Pucek-Kaczmarek A, Celary D, Bazylińska U. Natural-Origin Betaine Surfactants as Promising Components for the Stabilization of Lipid Carriers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(2):955. <https://doi.org/10.3390/ijms25020955>.
29. Abulfadle KA SA. Role of obestatin in improvement of obesity-induced metabolic and kidney function changes in exercised rats. *American Journal of Biomedical Sciences*. 2019;11(2):74-89. <https://doi.org/10.5099/aj190200074>.
30. de Melo DG, da Cruz Rodrigues VC, de Sá Pereira GJ, de Campos TDP, dos Santos Canciglieri R, Pauli JR, et al. Effects of aerobic exercise on the regulation of mitochondrial carrier homolog-2 and its influence on the catabolic and anabolic activity of lipids in the mesenteric adipose tissue of obese mice. *Life Sciences*. 2024;345:122567. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122567>.

31. Liu J, Liu Y, Chen Y, Liu Y, Huang C, Luo Y, et al. Betaine alleviates nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) via a manner involving BHMT/FTO/m(6)A/ PGC1 $\alpha$  signaling. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2024;134:109738. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109738>.
32. Gonzalo-Encabo P, Maldonado G, Valadés D, Ferragut C, Pérez-López A. The role of exercise training on low-grade systemic inflammation in adults with overweight and obesity: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(24). <https://doi.org/10.3390/ijerph182413258>.
33. Olli K, Lahtinen S, Rautonen N, Tiihonen K. Betaine reduces the expression of inflammatory adipokines caused by hypoxia in human adipocytes. *British Journal of Nutrition*. 2013;109(1):43-9. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000888>.
34. Zhao G, He F, Wu C, Li P, Li N, Deng J, et al. Betaine in inflammation: Mechanistic aspects and applications. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1070. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01070>.
35. Straznicky NE GM, Lambert EA, Eikelis N, Dawood T, Lambert GW, Nestel PJ, et al. Exercise augments weight loss induced improvement in renal function in obese metabolic syndrome individuals. *Journal of Hypertension*. 2011;29(3):553-64. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3283418875>.
36. Zaman GS AM, Ahmad I, Dera AA, Alshahrani MS, Ahmad I, Alam MM, et al. The impact of body resistance training exercise on biomedical profile at high altitude: A randomized controlled trial. *BioMed Research International*. 2021;2021(1):6684167. <https://doi.org/10.1155/2021/6684167>.
37. Babu LK SS, Ghosh D. Bone mineral metabolism and different indices of skeletal health of Ladakhi women living at high altitude. *Osteoporosis and Sarcopenia*. 9(4):131-6. <https://doi.org/10.1016/j.afos.2023.11.001>.
38. Morales E VM, León M, Hernández E, Praga M. Beneficial effects of weight loss in overweight patients with chronic proteinuric nephropathies. *American Journal of Kidney Diseases*. 2003;41(2):319-27. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2003.50039>.
39. Popov DV, Lysenko EA, Miller TF, Bachinin AV, Perfilov DV, Vinogradova OL. The effect of single aerobic exercise on the regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscles of trained men: A time-course study. *Human Physiology*. 2015;41(3):296-303. <https://doi.org/10.1134/S0362119715030123>.
40. Takahashi H, Kotani K, Tanaka K, Egucih Y, Anzai K. Therapeutic Approaches to Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Exercise Intervention and Related Mechanisms. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:588. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00588>.
41. Jung GY, Won SB, Kim J, Jeon S, Han A, Kwon YH. Betaine alleviates hypertriglycemia and Tau hyperphosphorylation in db/db Mice. *Toxicological Research*. 2013;29(1):7-14. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.1.007>.
42. Yang W, Huang L, Gao J, Wen S, Tai Y, Chen M, et al. Betaine attenuates chronic alcohol-induced fatty liver by broadly regulating hepatic lipid metabolism. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(4):5225-34. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7295>.
43. Ma J, Meng X, Kang SY, Zhang J, Jung HW, Park Y-K. Regulatory effects of the fruit extract of *Lycium chinense* and

its active compound, betaine, on muscle differentiation and mitochondrial biogenesis in C2C12 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;118:109297. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109297>.

44. Fromenty B, Roden M. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2023;78(2):415-29. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.09.020>.

45. Trang K, Grant SF. Genetics and epigenetics in the obesity phenotyping scenario. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2023;24(5):775-93. <https://doi.org/10.1007/s11154-023-09804-6>.

46. Toh SA LM, Rader D. Atherogenic lipid metabolism in obesity. In *Metabolic Basis of Obesity*. 2010:pp. 293-309. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1607-5>.