

The effect of moderate-intensity interval training combined with nanoemulsified betaine supplementation on hepatic expression of GLUT4, SREBP-1c, LXR α , and KLF15 genes in obese rats

Negin Chehrazhi¹, Foad Feizollahi^{2*}, Alireza Rahimi³, Amir Sarshin²

- 1- PhD Student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.
- 2- Assistant Professor at Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.
- 3- Associate Professor at Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Extended Abstract

Background and Aim: Obesity and its associated metabolic disorders, particularly non-alcoholic fatty liver disease, are characterized by excessive lipid accumulation in hepatocytes, hepatic insulin resistance, and activation of lipogenic pathways. At the molecular level, obesity is accompanied by reduced expression of glucose transporter 4 (GLUT4) and Krüppel-like factor 15 (KLF15), which are related to glucose homeostasis, and increased expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) and liver X receptor alpha (LXR α), two major regulators of hepatic lipogenesis. Moderate-intensity interval training (MIIT) may improve insulin sensitivity and suppress lipogenesis, whereas betaine has anti-steatotic, anti-inflammatory, and insulin-sensitizing properties. Nanoemulsification may increase betaine bioavailability and efficacy. However, the hepatic molecular responses to their combination have rarely been examined systematically. This study therefore investigated the independent and interactive effects of eight weeks of MIIT and nanoemulsified betaine supplementation on hepatic GLUT4, KLF15, SREBP-1c, and LXR α gene expression in obese rats and tested whether the combined interventions produced synergistic effects beyond either intervention alone.

Materials & Methods: This controlled experimental study included 25 eight-week-old male Wistar rats (257 ± 4 g) that free access to food and water. After two weeks of acclimatization, the rats were randomly assigned to five equal groups: healthy control, obese control, obese+MIIT, obese+nanoemulsified betaine, and obese+MIIT+nanoemulsified betaine. Except for the healthy control, the groups received a high-fat, high-cholesterol diet for 12 weeks; obesity induction was confirmed using body weight and serum glucose, lipid-profile, ALT, and AST criteria. The MIIT protocol was performed for eight weeks, five sessions weekly, on a zero-incline treadmill. Each 30-minute session comprised ten one-minute work bouts separated by two-minute active-recovery bouts at 5 m/min. Work-bout speed increased from 10 m/min (50% of maximal running speed) to 16 m/min (80%) by week four and remained unchanged through week eight. Nanoemulsified betaine (trimethylglycine hydrochloride) was administered by gavage at 50 mg/kg body weight before exercise, five days weekly for eight weeks. Forty-eight hours after the final intervention, rats were anesthetized with ketamine/xylazine, and 30 mg of the middle liver lobe was collected and stored at -80°C . Hepatic GLUT4, KLF15, SREBP-1c, and LXR α expression was quantified by qRT-PCR using GAPDH as the internal control and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. Normality and homogeneity were assessed by Shapiro-Wilk and Levene tests. Independent t-tests, two-way ANOVA, and Bonferroni post-hoc tests were performed in SPSS 26 at $p \leq 0.05$.

Results: No animals died, and all allocated animals and samples were included in the final analyses. Compared with the healthy control, obesity significantly reduced hepatic GLUT4 and KLF15 expression and increased SREBP-1c and LXR α expression ($p \leq 0.001$ for all genes), confirming substantial metabolic disruption in the obese model. Two-way ANOVA showed significant main effects of MIIT and nanoemulsified betaine on all four genes. Independently, each intervention increased GLUT4 and KLF15 and decreased SREBP-1c and LXR α ($p \leq 0.001$). MIIT produced larger effect sizes than betaine for increased GLUT4 ($\eta^2=0.82$ vs 0.48) and KLF15 ($\eta^2=0.79$ vs 0.54) and reduced LXR α ($\eta^2=0.94$ vs 0.82). Conversely, betaine had a somewhat larger effect on reducing SREBP-1c ($\eta^2=0.82$ vs 0.71). The interaction was significant only for SREBP-1c ($F=7.09$, $p=0.017$, $\eta^2=0.30$); interactions were not significant for GLUT4, KLF15, or LXR α . Thus, the two interventions acted independently for three targets but synergistically suppressed SREBP-1c. Simple-effect analyses also showed that MIIT significantly increased GLUT4 and KLF15 and decreased SREBP-1c and LXR α both with and without supplementation. Likewise, betaine significantly improved all four gene-expression outcomes in both trained and untrained conditions. Bonferroni comparisons confirmed higher GLUT4 and KLF15 and lower SREBP-1c and LXR α in the combined group than in the MIIT-only and betaine-only groups, while the interaction test identified synergy exclusively for SREBP-1c.

Table 1. Two-way analysis of variance results for the effects of the study interventions on relative gene expression ($2^{\Delta\Delta CT}$)

Variables	Source	Sum of Squares	df	F	p	Eta Squared η^2
GLUT4	MIIT	51.02	1	74.60	<0.001*	0.82
	Nanoemulsified betaine	10.48	1	15.32	0.001**	0.48
	MIIT $\times$ Nanoemulsified betaine	0.07	1	0.10	0.752	0.01
KLF15	MIIT	57.88	1	61.05	<0.001*	0.79
	Nanoemulsified betaine	17.85	1	18.84	0.001**	0.54
	MIIT $\times$ Nanoemulsified betaine	0.03	1	0.03	0.853	0.01
SREBP-1c	MIIT	0.79	1	39.28	<0.001*	0.71
	Nanoemulsified betaine	1.51	1	75.74	<0.001**	0.82
	MIIT $\times$ Nanoemulsified betaine	0.14	1	7.09	0.017***	0.30
LXR α	MIIT	1.86	1	271.20	<0.001*	0.94
	Nanoemulsified betaine	0.52	1	76.51	<0.001**	0.82
	MIIT $\times$ Nanoemulsified betaine	0.01	1	1.92	0.184	0.10

* Indicates a significant effect of MIIT on the research indices; ** Indicates a significant effect of Nanoemulsified betaine on the research indices; *** Indicates a significant interactive effect of MIIT and nanoemulsified betaine on the research indices. Significance level $p \leq 0.05$. GLUT4: Glucose transporter-4; KLF15: Krüppel-like factor 15; SREBP-1c: Sterol regulatory element-binding protein-1c; LXR α : Liver X receptor alpha

Conclusion: Eight weeks of MIIT and nanoemulsified betaine supplementation each independently shifted hepatic metabolic gene expression toward improved insulin sensitivity and reduced lipogenesis in obese rats. MIIT exerted comparatively stronger effects on GLUT4, KLF15, and LXR α , whereas betaine showed a somewhat stronger independent effect on SREBP-1c. Combining the interventions did not provide a significant synergistic advantage for GLUT4, KLF15, or LXR α , suggesting convergence on common final pathways or a physiological ceiling. The significant interaction for SREBP-1c was the important exception and indicated stronger suppression of this central lipogenic regulator when both interventions were applied. Mechanistically, MIIT may activate AMPK through increased energy demand and muscle-derived signals, thereby promoting GLUT4 expression, improving insulin signaling, phosphorylating SREBP-1c to limit its nuclear entry, and reducing endogenous LXR α ligands as hepatic lipid content declines. Betaine may facilitate the methionine–homocysteine cycle and S-adenosylmethionine-dependent DNA and

histone methylation, reduce endoplasmic-reticulum stress, and activate AMPK through changes in the AMP/ATP ratio. Their selective synergy on SREBP-1c may therefore reflect complementary suppression: MIIT reduces its upstream activator LXR α and limits its activation, whereas betaine restricts SREBP-1c promoter accessibility and proteolytic activation. Accordingly, either intervention alone may be sufficient to target insulin sensitivity and hepatic lipogenesis, while their combination may be particularly useful for suppressing SREBP-1c and potentially reducing obesity-related fatty liver.

Keywords: Aerobic Exercise, Betaine, Lipid Metabolism.

Ethical Considerations: Animal welfare principles were observed.

Compliance with Ethical Guideline: Approved by the Islamic Azad University ethics committee (IR.IAU.K.REC.1405.021) and conducted according to IACUC principles.

Funding: The study costs were borne by the researcher. The author also thanks the Physiology Laboratory of the Karaj Branch of Islamic Azad University for their sincere cooperation.

Conflicts of Interest: All authors hereby declare that there are no conflicts of interest in this research.

Issue in Progress



اثر تمرین تناوبی با شدت متوسط به همراه مکمل بتائین نانوامولسیون شده بر بیان

کبدی ژن های GLUT4، SREBP-1c، LXR α و KLF15 در موش های چاقنگین چهارزی^۱، فواد فیض الهی^{۲*}، علیرضا رحیمی^۳، امیر سرشین^۲

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- استادیار گروه فیزیولوژی ورزش، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۳- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: تمرین تناوبی با بهبود حساسیت انسولینی و بتائین از طریق کاهش لیپوژنز کبدی هر یک به تنهایی توانایی تعدیل اختلالات متابولیک ناشی از چاقی را دارند. هدف این مطالعه بررسی اثر تمرین تناوبی با شدت متوسط (MIIT) به همراه مکمل بتائین نانوامولسیون شده بر بیان کبدی ژن های بیان ناقل گلوکز-۴ (GLUT4)، پروتئین متصل شونده به عنصر تنظیمی استرول-۱ سی (SREBP-1c)، گیرنده ی X کبدی-آلفا (LXR α) و عامل شبه کروپل-۱۵ (KLF15) در موش های چاق بود. **روش تحقیق:** ۲۵ سر موش صحرایی به پنج گروه مساوی شامل کنترل سالم، کنترل چاق، چاق+MIIT، چاق+بتائین نانوامولسیون شده، چاق+MIIT+بتائین نانوامولسیون شده تقسیم شدند. گروه های چاق به مدت ۱۲ هفته با رژیم غذایی پرچرب و کلسترول تغذیه شدند. پروتکل MIIT به مدت هشت هفته شامل دویدن ۳۰ دقیقه ای، با سرعت و هله های فعالیتی ۱۰ تا ۱۶ متر/دقیقه و پنج روز در هفته انجام شد؛ گاوآژ مکمل نانوامولسیفیه بتائین با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن صورت گرفت. بیان کبدی ژن های GLUT4، SREBP-1c، LXR α و KLF15 به روش qRT-PCR بررسی شد. داده ها توسط آزمون های t-مستقل و تحلیل واریانس دوعاملی در سطح $p < 0.05$ تحلیل شدند. **یافته ها:** چاقی بیان GLUT4 و KLF15 را کاهش و SREBP-1c و LXR α را افزایش داد ($p < 0.001$ برای تمامی ژن ها). MIIT و مکمل هر کدام به طور جداگانه باعث افزایش GLUT4، KLF15 و هم چنین کاهش SREBP-1c و LXR α شدند ($p < 0.001$ برای هر دو مداخله؛ برای تمامی ژن ها). تعامل دو مداخله فقط باعث کاهش معنی دار SREBP-1c گردید ($p = 0.017$). **نتیجه گیری:** مداخلات MIIT و بتائین نانوامولسیون شده هر یک به طور مستقل الگوی بیان ژن های متابولیک کبدی را در جهت بهبود مقاومت به انسولین و کاهش لیپوژنز تعدیل می کنند. اما تعامل این دو مداخله و اثر سینرژیستی آن ها فقط به طور اختصاصی سبب سرکوب قوی تر SREBP-1c می شود که می تواند در کاهش لیپوژنز کبدی و بهبود کبد چرب مرتبط با چاقی حائز اهمیت باشد.

واژه های کلیدی: ورزش هوازی، بتائین، کبد چرب، متابولیسم چربی.

The effect of moderate-intensity interval training combined with nanoemulsified betaine supplementation on hepatic expression of GLUT4, SREBP-1c, LXR α , and KLF15 genes in obese rats

Negin Chehrazhi¹, Foad Feizollahi^{2*}, Alireza Rahimi³, Amir Sarshin²

1- Ph.D Student in Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- * Assistant Professor at Department of exercise physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran

3- Associate Professor at Department of exercise physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Background and Aim: Interval training by improving insulin sensitivity and betaine by reducing hepatic lipogenesis each have the ability to modulate metabolic disorders caused by obesity. The aim of this study was to investigate the effect of moderate-intensity interval training (MIIT) along with nanoemulsified betaine supplementation on the hepatic expression of glucose transporter-4 (GLUT4), sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), liver X receptor-alpha (LXR α), and Kröppel-like factor-15 (KLF15) genes in obese rats. **Materials and Methods:** 25 rats were divided into five equal groups including healthy control, obese control, obese+MIIT, obese+nanoemulsified betaine, and obese+MIIT+nanoemulsified betaine. The obese groups were fed a high-fat-cholesterol diet for 12 weeks. MIIT protocol was performed for eight weeks, including 30-minute running, with activity bouts speed of 10 to 16 m/min, five days a week; Nanoemulsified betaine supplementation was administered by gavage at a dose of 50 mg/kg body weight. The hepatic expression of GLUT4, SREBP-1c, LXR α , and KLF15 genes was examined by qRT-PCR. Data were analyzed by independent t-tests and two-way analysis of variance at the $p \leq 0.05$ level. **Findings:** Obesity decreased the expression of GLUT4 and KLF15 and increased SREBP-1c and LXR α ($p \leq 0.001$ for all genes). MIIT and supplementation each separately increased GLUT4, KLF15 and also decreased SREBP-1c and LXR α ($p \leq 0.001$ for both interventions; for all genes). The interaction of the two interventions only significantly reduced SREBP-1c ($p=0.017$). **Conclusion:** MIIT and nanoemulsified betaine interventions each independently modulate the expression pattern of hepatic metabolic genes to improve insulin resistance and reduce lipogenesis. However, the interaction of these two interventions and their synergistic effect only specifically causes stronger suppression of SREBP-1c, which could be important in reducing hepatic lipogenesis and improving obesity-related fatty liver.

Keywords: Aerobic Exercise, Betaine, Fatty Liver, Lipid Metabolism.



چاقی و اختلالات متابولیک مرتبط با آن، به‌ویژه بیماری کبد چرب غیرالکلی^۱ (NAFLD)، به یکی از مهم‌ترین چالش‌های نظام‌های سلامت در سراسر جهان تبدیل شده است (۱). تجمع بیش‌ازحد لیپیدها در هپاتوسیت‌ها نه تنها زمینه‌ساز استئاتوز کبدی است، بلکه از طریق القای مقاومت به انسولین و فعالسازی مسیرهای لیپوژنز، به پیشرفت طیف وسیعی از اختلالات متابولیک منجر می‌شود (۲). بنابراین، تعدیل مسیرهای مولکولی دخیل در متابولیسم کبدی، یک راهبرد درمانی کلیدی در مقابله با عوارض چاقی محسوب می‌شود.

در سطح مولکولی، چاقی و کبد چرب با تغییرات بارز در الگوی بیان ژن‌های کلیدی تنظیم‌کننده متابولیسم، از جمله کاهش بیان ناقل گلوکز-۴^۲ (GLUT4) همراه است (۳). این تغییرات منجر به اختلال در هموستاز گلوکز و تشدید مقاومت به انسولین می‌شود. اگرچه این ژن عمدتاً در بافت‌های چربی و عضلانی بیان می‌شود، اما شواهدی از بیان آن در شرایط پاتولوژیک کبدی گزارش شده است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی از ظرفیت برداشت گلوکز در هپاتوسیت‌ها مورد توجه قرار گیرد (۴). هم‌چنین عامل شبه کروپل-۱۵^۳ (KLF15) یک عامل رونویسی کلیدی در کبد است که گلوکونئوژنز را تنظیم می‌کند و کاهش آن با اختلال در هموستاز گلوکز مرتبط است (۵). در مقابل، پروتئین متصل‌شونده به عنصر تنظیمی استرول-۱ سی^۴ (SREBP-1c) و گیرنده‌ی X کبدی آلفا^۵ (LXRα) دو تنظیم‌کننده اصلی مسیر لیپوژنز کبدی هستند. افزایش بیان این دو ژن در چاقی، سنتز اسیدهای چرب و تجمع تری‌گلیسیرید در کبد را تقویت کرده و نقش محوری در پاتوژنز کبد چرب ایفا می‌کند (۶). از این‌رو، شناسایی مداخلاتی که بتوانند سطوح KLF15 و GLUT4 را افزایش و SREBP-1c و LXRα را کاهش دهند، از منظر بالینی حائز اهمیت هستند.

در میان مداخلات غیردارویی، تمرین تناوبی با شدت متوسط^۶ (MIIT) به‌عنوان یک استراتژی مؤثر و کم‌خطر، با قابلیت اجرای بهتر نسبت به تمرینات پرشدت و اثربخشی بیشتر نسبت به تمرینات تداومی، توجه محققان را به خود جلب کرده است (۷). شواهد موجود نشان می‌دهد که تمرین تناوبی از طریق فعالسازی مسیرهای سیگنالینگ وابسته به پروتئین کیناز فعال‌شده با AMP^۷ (AMPK) و هم‌فعال‌کننده-۱ آلفای گیرنده گامای فعال‌شده توسط تکثیرکننده پراکسیزومی^۸ (PGC-1α)، موجب بهبود حساسیت به انسولین و کاهش لیپوژنز در بافت‌های محیطی و کبد می‌شود (۸). با این حال، پاسخ‌های مولکولی کبد به این نوع تمرین، به‌ویژه در سطح تنظیم ژن‌های کلیدی لیپوژنز و برداشت گلوکز، نیازمند واکاوی دقیق‌تری است. در همین راستا، مطالعه‌ای اخیر (۲۰۲۶) در موش‌های چاق نشان داد که تمرین تناوبی پرشدت^۹ (HIIT)، بیان ژن‌های کلیدی لیپوژنز کبدی را کاهش و بیان ژن‌های بتا-اکسیداسیون را افزایش می‌دهد؛ این تغییرات حتی پس از دوره‌های بی‌تمرینی نیز تا حدی پایدار باقی می‌مانند (۹). همچنین در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۵ روی موش‌های دیابتی نوع ۲، هشت هفته HIIT با افزایش بیان

¹ Non-alcoholic fatty liver disease

² Glucose transporter-4

³ Krüppel-like factor 15

⁴ Sterol regulatory element-binding protein-1c

⁵ Liver X receptor alpha

⁶ Medium-intensity interval training

⁷ AMP-activated protein kinase

⁸ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha

⁹ High-intensity interval training



AMPK و PGC-1 α و کاهش هم‌زمان SREBP-1c و آنزیم‌های گلوکونئوزنیک کبدی همراه بود که به بهبود شاخص‌های حساسیت به انسولین و تنظیم بهتر تعادل گلوکز کبدی منجر شد (۱۰). با این حال این شواهد بیشتر از مدل تمرین پرشدت به‌دست آمده و داده‌های اختصاصی درباره پاسخ مولکولی کبد به MIIT همچنان محدود است.

در کنار مداخلات تمرینی، مکمل‌های تغذیه‌ای با منشأ طبیعی نیز به دلیل عوارض جانبی کمتر، کانون توجه قرار گرفته‌اند. بتائین (تری‌متیل‌گلیسین)^۱، یک ترکیب طبیعی با قابلیت اهدای گروه متیل و ویژگی اسمولیت^۲، در مطالعات متعدد اثرات ضدالتهابی، ضداستئاز و بهبود دهنده حساسیت به انسولین را در مدل‌های حیوانی چاقی و کبد چرب نشان داده است (۱۱). مکانیسم اثر بتائین عمدتاً از طریق تسهیل چرخه متیونین-هموسیستئین^۳، بهبود متیلاسیون دئوکسی نوکلئیک اسید^۴ (DNA) و هیستون‌ها و کاهش استرس شبکه آندوپلاسمی میانجی‌گری می‌شود (۱۲). با وجود این شواهد، فراهمی زیستی پایین بتائین پس از مصرف خوراکی، یکی از محدودیت‌های اصلی در استفاده بالینی از آن محسوب می‌شود. فناوری نانومولسیون با کاهش اندازه ذرات به محدوده نانومتر، افزایش سطح تماس و بهبود نفوذپذیری غشایی، می‌تواند فراهمی زیستی بتائین را افزایش داده و اثربخشی آن را ارتقا دهد (۱۳). علی‌رغم گزارش‌های اولیه در مورد اثرات مستقل MIIT و بتائین، پاسخ‌های مولکولی کبد به ترکیب این دو مداخله، به‌ویژه با به کارگیری فرم نانومولسیون‌شده بتائین، به طور سیستماتیک به‌ندرت بررسی شده است. در همین زمینه، نتایج پژوهش پورسلطانی زرنندی و دیگران (۲۰۲۶) در موش‌های صحرایی چاق نشان داد که ترکیب MIIT و مصرف بتائین نانومولسیون‌شده، به‌صورت اثر متقابل معنادار، بیان ژن التهابی CD28 کبدی و همچنین سطح سرمی تری‌گلیسرید، کلسترول تام، لیپوپروتئین کم‌چگال^۵ (LDL) و کراتینین را بیش از هر مداخله به‌تنهایی کاهش داد؛ این یافته‌ها نشان‌دهنده اثر سینرژیک ترکیب این دو مداخله بر مسیرهای متابولیک و التهابی کبد است (۱۴). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر (۲۰۲۲) روی موش‌های چاق، مصرف هم‌زمان بتائین در طول دوره تمرین هوازی، بهبودهای ناشی از تمرین در تحمل گلوکز و پاسخ انسولین را به‌طور معناداری تقویت کرد که تا حدی از طریق تغییر متابولیسم گلوکز و اثرات جزئی بر لیپید عضلانی میانجی‌گری می‌شد (۱۵). با این حال این شواهد هنوز بر پاسخ مولکولی کبد به ترکیب MIIT با فرم نانومولسیون‌شده بتائین به‌طور نظام‌مند متمرکز نشده‌اند.

در مجموع برای پر کردن این شکاف دانشی، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات مستقل و تعاملی MIIT و مکمل بتائین نانومولسیون‌شده بر بیان ژن‌های GLUT4، KLF15، SREBP-1c و LXR α در بافت کبد موش‌های چاق طراحی شد. علی‌رغم اثرات مثبت مستقل تمرین تناوبی و مکمل‌دهی بتائین بر پروفایل متابولیک در چاقی و کبد چرب، شواهد محدودی در خصوص اثرات تعاملی هم‌زمان این دو مداخله بر مسیرهای مولکولی دخیل در هموستاز گلوکز و لیپوژنر کبدی وجود دارد. با توجه به نقش محوری ژن‌های GLUT4 در انتقال گلوکز وابسته به انسولین، SREBP-1c و LXR α در تنظیم سنتز خودبه‌خودی اسیدهای چرب کبدی و KLF15 به‌عنوان تنظیم‌کننده حساسیت انسولینی و متابولیسم لیپید، بررسی الگوی بیان کبدی این ژن‌ها در پاسخ به ترکیب MIIT و بتائین نانومولسیون‌شده می‌تواند درک بهتری از پتانسیل سینرژیک این دو استراتژی در تعدیل اختلالات متابولیک ناشی از چاقی فراهم آورد. علاوه بر این، استفاده از فرمولاسیون نانومولسیفیه بتائین با هدف افزایش

¹ Trimethylglycine

² Osmolyte

³ Methionine homocysteine cycle

⁴ Deoxy nucleic acid

⁵ Low-density lipoprotein



مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش



زیست‌دسترسی و اثربخشی آن، رویکردی نوین در بهینه‌سازی مداخلات تغذیه‌ای محسوب می‌شود که اهمیت بالینی این مطالعه را دوچندان می‌سازد. بر اساس دانش موجود، دو فرضیه رقیب قابل طرح است: فرضیه نخست آن است که MIIT و بتائین نانومولسیون شده از طریق مسیرهای سیگنالینگ مکمل (به ترتیب مسیرهای وابسته به انقباض عضلانی و مسیرهای اپیژنتیک) عمل کرده و ترکیب آن‌ها اثرات سینرژیستی در تعدیل بیان ژن‌های هدف خواهد داشت. فرضیه جایگزین آن است که هر دو مداخله به مسیرهای نهایی مشترکی همگرا شده و ترکیب آن‌ها مزیت افزایشی فراتر از سقف پاسخ فیزیولوژیک ایجاد نمی‌کند. آزمون این فرضیه‌های رقیب، علاوه بر روشن‌سازی مبانی مولکولی اثرگذاری مداخلات ترکیبی، احتمالاً می‌تواند راهگشای طراحی راهبردهای مؤثرتر برای مدیریت عوارض کبدی ناشی از چاقی باشد.

روش تحقیق

نمونه‌های پژوهش: مطالعه حاضر در قالب یک طرح تجربی کنترل‌شده با هدف بررسی اثرات مستقل و تعاملی MIIT و مکمل بتائین نانومولسیفیه بر بیان ژن‌های GLUT4، KLF15، SREBP-1c و LXR α در بافت کبد موش‌های صحرایی چاق طراحی و اجرا گردید. علاوه بر این، یک گروه کنترل سالم غیر چاق نیز برای مقایسه با گروه‌های چاق در نظر گرفته شد. این آزمایش مطابق با دستورالعمل‌های بین‌المللی اخلاق زیستی و اصول کمیته نظارت بر مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی^۱ (IACUC) دانشگاه آزاد انجام شد و مجوز اخلاقی با کد IR.IAU.K.REC.1405/021 را دریافت نموده است. به‌جز گروه کنترل سالم، در مورد چهار گروه چاق، استفاده از طراحی فاکتوریل ۲×۲ در این مطالعه امکان ارزیابی همزمان اثرات مستقل و اثرات تعاملی متغیرهای مستقل را با حداقل تعداد حیوانات آزمایشگاهی (با توجه به دستورالعمل‌های جدید کمیته اخلاق) فراهم می‌سازد.

در این مطالعه، تعداد ۲۵ سر موش صحرایی بالغ نر و بیستار هشت هفته‌ای با میانگین وزن بدن 25.7 ± 4 گرم (تهیه شده از مرکز بافت و ژن پاسارگاد)، در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت 55 ± 4 درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. وزن‌کشی حیوانات با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۱ گرم به صورت هفتگی انجام گرفت تا روند تغییرات وزن بدن و اثربخشی رژیم غذایی پرچرب در القای فنوتیپ چاقی ارزیابی گردد.

روش اجرای پژوهش: موش‌های صحرایی پس از دو هفته سازگاری با محیط جدید، به صورت تصادفی به پنج گروه (پنج سر موش در هر گروه) شامل: کنترل سالم، کنترل چاق، چاق + MIIT، چاق + بتائین نانومولسیون‌شده، ۵- چاق + MIIT + بتائین نانومولسیون‌شده تقسیم شدند. گروه‌های چاق به مدت ۱۲ هفته با رژیم غذایی چرب و کلسترول دچار بیماری شدند و گروه سالم با رژیم غذایی استاندارد جوندگان تغذیه شدند. با توجه به عناصر تشکیل دهنده غذای استاندارد جوندگان، غذای پرچرب مورد استفاده برای القای کبد چرب شامل غذای پایه جوندگان (استاندارد) به‌علاوه ۱۵٪ چربی حیوانی، ۴٪ کلسترول (شرکت سیگما-آمریکا) و ۱٪ اسید کولیک (شرکت سیگما-آمریکا) بود که توسط شرکت بافت و ژن پاسارگاد روزانه تهیه گردیده و به صورت آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت (۱۶). 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 موش‌های

¹ Institutional animal care and use committee



صحرائی گرفته شد. سپس سطوح گلوکز و نیمرخ چربی (تری گلیسرید، کلسترول تام، LDL و لیپوپروتئین پرچگال^۱ (HDL) و آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز^۲ (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز^۳ (AST) که به عنوان شاخص‌های مهم در تشخیص کبد چرب محسوب می‌شوند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. افزایش سطح این شاخص‌ها (ALT سرم بالای ۶۰ واحد/لیتر، AST بالای ۱۴۰ واحد/لیتر، گلوکز بالای ۱۶۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر، تری گلیسرید و کلسترول بالای ۲۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر، LDL بالای ۱۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر و HDL کمتر از ۴۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر)، تاییدی بر ابتلای موش‌های صحرائی به چاقی قرار می‌گیرد (۱۷). هم‌چنین وزن موش‌های صحرائی تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب، پس از ۱۲ هفته مدلسازی به میانگین $399 \pm$ گرم رسید.

پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه، جهت آشنایی با پروتکل تمرین هوازی تناوبی دویدن روی نوارگردان و هم‌چنین تعیین شدت نسبی تمرین، موش‌های صحرائی گروه‌های تمرین ورزشی به مدت دو هفته و سه جلسه در هفته به تمرین پرداختند. در طول این دو هفته موش‌های گروه‌های تمرینی با دویدن روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه آشنا شدند. روز قبل از اجرای پروتکل تمرین هوازی تناوبی، پایلوت برنامه تمرینی بر روی پنج سر موش جهت برآورد حداکثر سرعت دویدن (سرعت رسیدن به واماندگی) مناسب پروتکل تمرین انجام شد؛ نمونه‌ها آزمون عملکرد ورزشی مدرج را با شیب صفر درجه اجرا کردند که با سرعت پنج متر بر دقیقه آغاز و سرعت نوارگردان به ازای هر دو دقیقه، دو متر بر دقیقه افزوده شد تا جایی که موش‌های صحرائی قادر به دویدن نباشند (واماندگی)؛ در این آزمون سرعت ۲۰ متر در دقیقه سرعت لازم جهت رسیدن به واماندگی حاصل گردید. پس از برآورد حداکثر سرعت، گروه‌های تمرینی، برنامه MIIT را با اقتباس از پروتکل سیاهپوترا^۴ و دیگران (۲۰۲۳) به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته اجرا نمودند. پروتکل MIIT شامل دویدن روی نوارگردان مجموعاً به مدت ۳۰ دقیقه همراه با اضافه بار تدریجی هفتگی بود؛ به‌طوری که هفته اول شامل ۱۰ وهله فعالیتی یک دقیقه‌ای با سرعت ۱۰ متر/دقیقه (۵۰ درصد حداکثر سرعت دویدن) با تناوب‌های استراحتی دو دقیقه‌ای با سرعت پنج متر/دقیقه بود و با حفظ نسبت کار به استراحت ۱:۲، هر هفته دو متر/دقیقه به سرعت وهله‌های فعالیت افزوده شد؛ به‌طوری که سرعت دویدن در وهله‌های فعالیتی در هفته چهارم به ۱۶ متر/دقیقه (۸۰ درصد حداکثر سرعت دویدن) رسید و این سرعت از هفته چهارم الی هشتم ثابت ماند تا پروتکل تمرینی در قالب MIIT استاندارد حفظ گردد (۱۸).

موش‌ها در گروه چاق + بتائین و گروه چاق + MIIT + بتائین، مکمل تری متیل گلیسین هیدروکلراید (بتائین) (شرکت سیگما، امریکا) را پس از نانوامولسیون‌سازی^۵، به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته قبل از تمرین به صورت گاواژ دریافت کردند (۱۹). هدف از نانوامولسیون‌سازی بتائین در این تحقیق در درجه اول افزایش فراهمی زیستی و کارایی این ترکیب بود که برای دستیابی به غلظت‌های درمانی موثر در مدل‌های حیوانی بسیار مهم است. زیرا بتائین نانوامولسیون شده می‌تواند منجر به جذب بهتر روده‌ای شده و در نتیجه، اثرات فیزیولوژیکی آن مانند کاهش استرس اکسیداتیو در حیوانات تحت شرایط اختلالات متابولیک افزایش می‌یابد. هم‌چنین در تحقیقاتی که بر محافظت از کبد

¹ High-density lipoprotein

² Alanine aminotransferase

³ Aspartate aminotransferase

⁴ Syahputra

⁵ Nanoemulsification

و اختلالات متابولیک متمرکز شده‌اند، بتائین نانومولسیون شده پتانسیل بالقوه‌ای در کاهش آسیب کبد و بهبود سلامت متابولیک نشان داده است و آن را به ابزاری ارزشمند در مطالعات تجربی تبدیل کرده است (۲۰).

از روش فراصوت با دامنه بالا برای تهیه نانومولسیون بتائین استفاده شد. روشی که با تشکیل ذرات کوچک‌تر، پایداری سرمی و فراهمی زیستی نانومولسیون را افزایش می‌دهد. به منظور تهیه نانومولسیون‌ها به روش مذکور، غلظت‌های مختلف بتائین و توئین-۸۰ با اسپان-۲۸۰ به عنوان سورفکتانت^۳ مخلوط شدند. سپس محلول در ابتدا با استفاده از هموژنایزر در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه همگن شد. پس از آن، سونیکاسیون به مدت سه دقیقه با حداکثر سرعت انجام شد. نانومولسیون‌های تهیه شده دارای ساختار شفاف و بدون کدورت 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 مشاهده نشد که پایداری طولانی مدت نانومولسیون‌ها و دوره نگهداری مشخص شده در دمای اتاق و یخچال را تایید می‌کند (۲۱).

به منظور از بین بردن اثرات حاد تمرین، ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی و گاواژ مکمل، بافت برداری کبد در هر گروه انجام شد. در طول دوره مطالعه هیچ‌گونه تلفات حیوانی رخ نداد و تمامی حیوانات تخصیص‌یافته به گروه‌ها تا پایان مطالعه باقی ماندند و در تحلیل‌های نهایی وارد شدند. همچنین، هیچ داده یا نمونه‌ای به‌عنوان داده پرت از تحلیل‌های آماری حذف نشد. حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین (مقدار ۸۰ به ۱۰ میلی گرم کتامین به زایلازین به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) بیهوش شدند و مقدار ۳۰ میلی گرم از لوب میانی بافت کبدی به دلیل پراکندگی نسبتاً یکنواخت چربی در این ناحیه بلافاصله برداشته شد. بافت نمونه هر حیوان بلافاصله در میکروتیوب وارد محلول نیتروژن مایع شد و در دمای ۸۰- درجه فریز گردید. نمونه در آزمایشگاه تا زمان انجام آزمایشات ارزیابی مقدار تغییرات بیان ژن در فریزر ۸۰- درجه نگهداری شد. بیان ژن‌های GLUT4، KLF15، SREBP-1c و LXRα با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی^۴ (Real-Time PCR) (سیستم‌های زیستی کاربردی، دستگاه‌های تشخیص توالی پرایمرها^۵) مورد بررسی قرار گرفت. استخراج ریبونوکلیک اسید^۶ (RNA) به صورت RNX-Pluse (یک معرف تجاری برای استخراج RNA) و به منظور بررسی کیفیت و کمیت آن از روش اسپکتروفوتومتری^۷ و الکتروفورز^۸ روی ژل آگارز^۹ استفاده شد. ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن‌های GLUT4، KLF15، SREBP-1c و LXRα با استفاده از سایت NCBI استخراج شد. آغازگرها^{۱۰} (پرایمرها) توسط نرم‌افزار کامپیوتری AllelID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST (ابزار پایه تطابق محلی توالی‌ها) جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از استخراج RNA، محصول دئوکسی نوکلئیک اسید مکمل^{۱۱} (cDNA) ساخته شد؛ به این منظور، ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج‌شده با یک میکرولیتر رندوم هگزامر به هر نمونه اضافه و یک میکرولیتر دئوکسی

¹ Tween 80

² Span 80

³ Surfactant

⁴ Real-time polymerase chain reaction

⁵ Applied biosystems, sequence detection systems

⁶ Ribonucleic acid

⁷ Spectrophotometry

⁸ Electrophoresis

⁹ Agarose gel

¹⁰ Primers

¹¹ Complementary deoxynucleic acid



علوم زیستی در ورزش

مطالعات کاربردی



نوکلئوتید تری فسفات‌ها^۱ (dNTPs) به هر میکروتیوب اضافه شد. میکروتیوب حاوی محلول بالا به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد تا ساختارهای ثانویه از بین برود. به ازای هر نمونه، دو میکرولیتر از بافر x10، یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌بردار معکوس و یک میکرولیتر از مهارکننده آنزیم تجزیه‌گر RNA^۲، اضافه و بلافاصله میکروتیوب‌ها به مدت یک دقیقه روی یخ قرار داده شد. نمونه‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر^۳ قرار داده شده و زمان‌بندی شامل ۲۵ درجه سلسیوس در پنج دقیقه، ۵۵ درجه سلسیوس برای ۶۰ دقیقه و ۸۵ درجه سلسیوس در پنج دقیقه اجرا شد. پس از پایان کار، نمونه‌ها به دمای ۲۰-درجه سلسیوس منتقل شدند. روش cDNA سازی مربوط به شرکت Gene All کره است. فرایند زمان واقعی^۴ به صورت دو مرحله‌ای انجام شد. مرحله سنتز cDNA با استفاده از کیت هایپراسکریپت^۵ شرکت Gene All کره جنوبی طبق روش ذکر شده انجام گرفت. مرحله تکثیر نیز با استفاده از مستر آماده سایبرگرین^۶ متعلق به شرکت AMPLIQON با نام تجاری RealQ Plus 2x Master Mix Green صورت گرفت. این مستر به صورت شروع سریع در دمای بالا^۷ است و برای انجام مرحله تکثیر، تنها به مستر پرایمر، آب و cDNA اضافه شد. روش دمایی نیز شامل یک چرخه ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، فعال سازی آنزیم شروع سریع DNA پلی‌راز مقاوم به حرارت^۸ (TEMPase) و در پی آن ۲۵-۳۵ چرخه ۱۵-۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس (ثبت انعکاس نور فلوئورسنت در طول مراحل اتصال پرایمر و گسترش) و انتخاب دمای مناسب بر پایه دمای اتصال آغازگرها انجام شد. برای کمی سازی مقادیر بیان ژن هدف موردنظر، از فرمول $\Delta\Delta CT$ ^۹ استفاده شد. در این تحقیق از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز^۹ (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer Sequence
r-GLUT4-F	GAAGTGGGAAGCTGGAGGGAG
r-GLUT4-R	TAGGGGTAAGAGGAAGGCAGGA
r-KLF15-F	CAGAGACGTTGTGCTGCTTTC
r-KLF15-R	CGAGGGCAACATGTGGTATGG
r-SREBP-1c-F	CGTTGTACTGCAGCCACACTT
r-SREBP-1c-R	TAGTCGGTGGATGGGCAGTTT

¹ Deoxynucleotide triphosphate

² RNase inhibitor

³ Thermocycler

⁴ Real-time

⁵ Hyper script

⁶ Cybergreen master

⁷ Hot tart

⁸ Thermostable DNA polymerase hot start

⁹ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

r-LXR α -F	ACCTCAAGATGCAGGAGACCA
r- LXR α -R	TGTGGACGAAGTTCTGTAGGC
r-GAPDH-F	GGATAGTGAGAGCAAGAGAGAGG
r-GAPDH-R	ATGGTATTGGAGAGAAGGGAGGG

روش‌های آماری: داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شدند. قبل از تجزیه و تحلیل آماری، همه متغیرها از نظر توزیع طبیعی با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک^۱ و از نظر همگنی واریانس‌ها با آزمون لون^۲ بررسی شدند. جهت تجزیه و تحلیل استنباطی داده‌ها از آزمون‌های t-مستقل، تحلیل واریانس دوعاملی و آزمون تعقیبی بونفرونی^۳ در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ استفاده شد.

یافته‌ها

یافته‌های توصیفی متغیرهای مورد مطالعه در پس‌آزمون نمونه‌های پژوهش حاضر در جدول دو نشان داده شده است.

جدول ۲. توصیف بیان ژن‌ها بر مبنای واحد $\Delta\Delta CT_{-18}$ پس از مداخله به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد

گروه‌ها	کنترل سالم	کنترل چاق	چاق + MIIT	چاق + بتائین	چاق + MIIT + بتائین نانوامولوسیون شده
GLUT4	$4/84 \pm 0/66$	$1/00 \pm 0/05$	$4/31 \pm 0/81$	$2/57 \pm 0/39$	$5/64 \pm 1/38$
KLF15	$4/19 \pm 0/86$	$1/00 \pm 0/10$	$4/48 \pm 0/39$	$2/97 \pm 1/05$	$6/29 \pm 1/50$
SREBP-1c	$0/07 \pm 0/02$	$1/02 \pm 0/17$	$0/45 \pm 0/06$	$0/30 \pm 0/21$	$0/08 \pm 0/02$
LXR α	$0/02 \pm 0/01$	$0/99 \pm 0/03$	$0/33 \pm 0/09$	$0/62 \pm 0/13$	$0/06 \pm 0/01$

GLUT4: ناقل گلوکز ۴؛ KLF15: عامل شبه کروپل ۱۵؛ SREBP-1c: پروتئین متصل‌شونده به عنصر تنظیمی استرول (c)؛ LXR α : گیرنده‌ی X کبدی آلفا.

پیش فرض این مطالعه، بررسی تاثیر ابتلا به چاقی بر بیان ژن‌های GLUT4، KLF15، SREBP-1c و LXR α در موش‌های مدل بود. از آنجا که این نوع هدف در پژوهش‌های پیشین به انجام رسیده است، تنها مطلوب این پیش فرض، اطمینان از مدل‌سازی چاقی و تاثیر آن بر شاخص‌های مورد مطالعه ما در نمونه‌های مدل می‌باشد. جهت بررسی این پیش فرض و تعیین تفاوت بین دو گروه کنترل سالم و کنترل چاق از روش آماری تی-مستقل استفاده شد که نتایج آن در جدول سه ارائه شده است:

جدول ۳. نتایج آزمون t-مستقل جهت تعیین تفاوت بین دو گروه کنترل سالم و کنترل چاق

متغیر	t	df	p
GLUT4	۱۲/۸۸	۸	$< 0.001^*$

¹ Shapiro-wilk

² Levene

³ Bonferoni

$<0.001^*$	۸	۸/۱۶	KLF15
$\leq 0.001^*$	۸	-۱۲/۴۰	SREBP-1c
$<0.001^*$	۸	-۶۳/۰۷	LXR α

* نشانه اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در سطح $p \leq 0.05$

نتایج آزمون t-مستقل (جدول سه) در مورد بررسی تفاوت‌های بین گروهی نشان داد که بیان ژن‌های GLUT4، KLF15، SREBP-1c و LXR α در گروه کنترل چاق یا مدل در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معناداری تغییر کرده است ($p \leq 0.001$)؛ به طوری که چاقی منجر به کاهش معنی‌دار بیان GLUT4 و KLF15 و همچنین افزایش معنی‌دار SREBP-1c و LXR α شد.

نتایج روش آماری تحلیل واریانس دوعاملی و آزمون تعقیبی بونفرونی برای تعیین اثربخشی مستقل MIIT، مکمل بتائین و هم‌چنین اثر تعاملی هر دو بر متغیرهای مورد مطالعه در جدول چهار قابل مشاهده است:

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوعاملی در مورد بررسی اثرسنجی مداخلات پژوهشی بر بیان نسبی ژن‌ها بر مبنای واحد $\Delta\Delta CT$ -۸۲

متغیرها	نوع مداخله	مجموع مربعات	درجه آزادی	F	p	اندازه اثر (η^2)
GLUT4	MIIT	۵۱/۰۲	۱	۷۴/۶۰	$<0.001^*$	۰/۸۲
	بتائین نانوامولوسیون شده	۱۰/۴۸	۱	۱۵/۳۲	0.001^{**}	۰/۴۸
	بتائین MIIT نانوامولوسیون شده ×	۰/۰۷	۱	۰/۱۰	۰/۷۵۲	۰/۰۱
KLF15	MIIT	۵۷/۸۸	۱	۶۱/۰۵	$<0.001^*$	۰/۷۹
	بتائین نانوامولوسیون شده	۱۷/۸۵	۱	۱۸/۸۴	0.001^{**}	۰/۵۴
	بتائین MIIT نانوامولوسیون شده ×	۰/۰۳	۱	۰/۰۳	۰/۸۵۳	۰/۰۱
SREBP-1c	MIIT	۰/۷۹	۱	۳۹/۲۸	$<0.001^*$	۰/۷۱
	بتائین نانوامولوسیون شده	۱/۵۱	۱	۷۵/۷۴	$<0.001^{**}$	۰/۸۲
	بتائین MIIT نانوامولوسیون شده ×	۰/۱۴	۱	۷/۰۹	0.001^{***}	۰/۳۰
LXR α	MIIT	۱/۸۶	۱	۲۷۱/۲۰	$<0.001^*$	۰/۹۴
	بتائین نانوامولوسیون شده	۰/۵۲	۱	۷۶/۵۱	$<0.001^{**}$	۰/۸۲

 جمهوری اسلامی ایران مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش  					
۰/۱۰	۰/۱۸۴	۱/۹۲	۱	۰/۰۱	بتائین MIIT نانوامولوسیون شده ×

* نشانه اثر معنی دار MIIT بر شاخص های تحقیق؛ ** نشانه اثر معنی دار کامل بتائین بر شاخص های تحقیق؛ *** نشانه اثر تعاملی معنی دار MIIT و مکمل بتائین بر شاخص های تحقیق؛ سطح معنی داری $p < 0.05$.

با عنایت به جدول چهار، به طور کلی نتایج آزمون تحلیل واریانس دوعاملی نشان می دهد که یک دوره تمرین MIIT در تعامل با مکمل بتائین فقط باعث کاهش معنی دار بیان SREBP-1c ($p = 0.017$)، $F = 7.09$ ، اندازه اثر، 0.30 ، در کبد موش های چاق می شود. در حالی که مداخله همزمان تمرین و مکمل تاثیر تعاملی معنی داری بر بیان ژن های GLUT4 ($p = 0.752$)، $F = 0.01$ ، اندازه اثر، $F = 0.10$ ، $p = 0.853$) KLF15، $F = 0.03$ ، اندازه اثر، 0.01 ، و LXR α ($p = 0.184$)، $F = 1.92$ ، اندازه اثر، ندارد.

با بررسی اندازه های اثر، به نظر می رسد که اثر جداگانه تمرین MIIT در قیاس با اثر جداگانه مکمل بتائین در افزایش معنی دار بیان ژن های GLUT4 (0.82 ، اندازه اثر برای تمرین و 0.48 ، اندازه اثر برای مکمل) و KLF15 (0.79 ، اندازه اثر برای تمرین و 0.54 ، اندازه اثر برای مکمل) و کاهش معنی دار LXR α (0.94 ، اندازه اثر برای تمرین و 0.82 ، اندازه اثر برای مکمل) به مراتب بیشتر باشد؛ اما اثر مکمل تنها نسبت به تمرین تنها در کاهش معنی دار SREBP-1c تا حدی بیشتر بود (0.71 ، اندازه اثر برای تمرین و 0.82 ، اندازه اثر برای مکمل).

نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در مورد اثر تعاملی تمرین و مکمل بر تغییرات شاخص های مورد مطالعه نشان داد که اثر ساده تمرین بر بیان نسبی ژن های GLUT4 ($p < 0.001$)، 0.68 ، اندازه اثر، 3.08 ، اختلاف میانگین ها)، KLF15 ($p < 0.001$)، 0.64 ، اندازه اثر، 3.32 ، اختلاف میانگین ها)، SREBP-1c ($p = 0.021$)، 0.29 ، اندازه اثر، -0.23 ، اختلاف میانگین ها) و LXR α ($p < 0.001$)، 0.88 ، اندازه اثر، -0.56 ، اختلاف میانگین ها) در سطح دریافت مکمل معنی دار است؛ در واقع، تمرین در صورت دریافت مکمل، منجر به افزایش معنی دار بیان نسبی ژن های GLUT4 و KLF15 و همچنین کاهش بیان نسبی ژن های SREBP-1c و LXR α می شود؛ در تأیید این یافته ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان داد که بیان ژن های GLUT4 و KLF15 در نمونه هایی که مداخله همزمان تمرین و مکمل دریافت نمودند، در قیاس با نمونه هایی که مداخله مکمل تنها را دریافت کردند، بالاتر بوده و بیان ژن های SREBP-1c و LXR α در همین نمونه ها پایین تر است.

هم چنین، اثر ساده تمرین بر بیان نسبی ژن های GLUT4 ($p < 0.001$)، 0.71 ، اندازه اثر، 3.31 ، اختلاف میانگین ها)، KLF15 ($p < 0.001$)، 0.67 ، اندازه اثر، 3.48 ، اختلاف میانگین ها)، SREBP-1c ($p < 0.001$)، 0.71 ، اندازه اثر، -0.57 ، اختلاف میانگین ها) و LXR α ($p < 0.001$)، 0.91 ، اندازه اثر، -0.66 ، اختلاف میانگین ها) در سطح بدون مکمل نیز معنی دار است. در واقع، تمرین در حالت بدون مکمل هم منجر به افزایش معنی دار بیان نسبی ژن های GLUT4 و KLF15 و همچنین کاهش بیان نسبی ژن های SREBP-1c و LXR α می شود؛ در تأیید این یافته ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان داد که بیان ژن های GLUT4 و KLF15 در نمونه هایی که مداخله تمرین تنها را دریافت نمودند در قیاس با نمونه های بدون مداخله تمرینی و مکمل، بالاتر بوده و بیان ژن های SREBP-1c و LXR α در همین نمونه ها پایین تر است.

به علاوه، نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در مورد اثر تعاملی تمرین و مکمل بر تغییرات شاخص های مورد مطالعه نشان داد که اثر ساده مکمل بر بیان نسبی ژن های GLUT4 ($p = 0.022$)، 0.29 ، اندازه اثر، 1.33 ، اختلاف میانگین ها)، KLF15 ($p = 0.010$)، 0.35 ، اندازه اثر، 1.81 ، اختلاف میانگین ها)، SREBP-1c ($p = 0.001$)، 0.53 ، اندازه اثر، -0.38 ، اختلاف میانگین ها) و LXR α ($p < 0.001$)، 0.63 ، اندازه اثر، -0.27 ، اختلاف میانگین ها) در سطح تمرین کرده معنی دار است؛ در واقع، مکمل در حالت تمرین کرده منجر به افزایش معنی دار بیان نسبی ژن های GLUT4 و KLF15 و همچنین کاهش بیان نسبی ژن های SREBP-1c

و LXR α می‌شود؛ در تأیید این یافته‌ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان داد که بیان ژن‌های GLUT4 و KLF15 در نمونه‌هایی که مداخله همزمان تمرین و مکمل دریافت نمودند، در قیاس با نمونه‌های با مداخله تمرین تنها، بالاتر است و بیان ژن‌های SREBP-1c و LXR α در همین نمونه‌ها پایین‌تر است.

دیگر آن که اثر ساده مکمل بر بیان نسبی ژن‌های GLUT4 ($p=0/009$ ، Δ اندازه اثر، $1/57$ =اختلاف میانگین‌ها)، KLF15 ($p=0/006$ ، Δ اندازه اثر، $1/97$ =اختلاف میانگین‌ها)، SREBP-1c ($p<0/001$ ، Δ اندازه اثر، $0/72$ =اختلاف میانگین‌ها) و LXR α ($p<0/001$ ، Δ اندازه اثر، $0/38$ =اختلاف میانگین‌ها) در سطح بدون تمرین نیز معنی‌دار بود؛ در واقع، مکمل در حالت بدون تمرین، منجر به افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن‌های GLUT4 و KLF15 و همچنین کاهش بیان نسبی ژن‌های SREBP-1c و LXR α می‌شود؛ در تأیید این یافته‌ها، نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز نشان‌دهنده بیان ژن‌های GLUT4 و KLF15 بالاتر و همچنین بیان پایین‌تر ژن‌های SREBP-1c و LXR α در نمونه‌هایی است که مداخله مکمل تنها را دریافت نمودند در قیاس با نمونه‌هایی که هیچ مداخله تمرینی و مکملی را دریافت نکردند. در تحلیل تکمیلی، تغییرات چند برابری بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه و میزان بازگشت به سطوح پایه سالم در جدول پنج قابل مشاهده است:

جدول ۵. تغییرات چندبرابری بیان نسبی ژن‌ها و درصد تغییرات آن‌ها نسبت به گروه کنترل چاق بر مبنای میانگین‌ها

ژن	گروه ها	تغییرات نسبی چند		درصد تغییرات بیان	تفسیر (نسبت به گروه چاق-کنترل)
		برابری بیان ژن (Log2 Fold Changes)	± SE_log2 (FC)		
GLUT4	پایه سالم	۲/۲۷	۰/۱۵	+۳۸۳ %	سطح سالم بیان ژن
	چاق + MIIT	۲/۱۰	۰/۲۰	+۳۳۰ %	افزایش ۴/۳ برابری بیان ژن
	چاق + بتائین نانوامولوسیون شده	۱/۳۶	۰/۱۶	+۱۵۶ %	افزایش ۲/۶ برابری بیان ژن
	چاق + MIIT + بتائین نانوامولوسیون شده	۲/۴۹	۰/۲۷	+۴۶۲ %	افزایش ۵/۶ برابری بیان ژن (فراتر از سطح کنترل)
KLF-15	پایه سالم	۲/۰۷	۰/۲۲	+۳۱۹ %	سطح سالم بیان ژن
	چاق + MIIT	۲/۱۶	۰/۰۹	+۳۴۸ %	افزایش ۴/۵ برابری بیان ژن
	چاق + بتائین نانوامولوسیون شده	۱/۵۷	۰/۳۷	+۱۹۷ %	افزایش ۳ برابری بیان ژن
	چاق + MIIT + بتائین نانوامولوسیون شده	۲/۶۵	۰/۲۶	+۵۲۹ %	افزایش ۶/۳ برابری بیان ژن (بیشترین اثر- فراتر از سطح کنترل)
SREBP-1c	پایه سالم	-۳/۸۹	۰/۲۷	-۹۳/۲ %	سطح سالم بیان ژن
	چاق + MIIT	-۱/۱۸	۰/۱۴	-۵۵/۹ %	کاهش متوسط بیان ژن (۲/۴ برابر)
	چاق + بتائین نانوامولوسیون شده	-۱/۷۷	۰/۷۳	-۷۰/۶ %	کاهش قابل توجه بیان ژن (۳/۵ برابر)
	چاق + MIIT + بتائین نانوامولوسیون شده	-۳/۷۵	۰/۲۲	-۹۲/۵ %	کاهش شدید بیان ژن (۷/۵ برابر — بازگشت)



علوم زیستی در ورزش

مطالعات کاربردی



تقریباً کامل به سطح کنترل					
سطح سالم بیان ژن	۹۸٪ -	۰/۴۱	۵/۶۳ -	پایه سالم	LXR α
کاهش قابل توجه بیان ژن (۳/۲ برابر)	۶۶/۷٪ -	۰/۲۸	۱/۵۹ -	چاق + MIIT	
کاهش ۱/۳ برابر بیان ژن	۳۷/۴٪ -	۰/۲۲	۰/۶۷ -	چاق + بتائین نانومولوسیون شده	
کاهش شدید بیان ژن (۷/۸ برابر - نزدیک به سطح کنترل)	۹۳/۴٪ -	۰/۱۳	۳/۹۳ -	چاق + MIIT + بتائین نانومولوسیون شده	

توضیح: داده‌ها بر اساس مقیاس لوگاریتمی تغییرات نسبی چند برابری (Log2 fold changes) در قیاس با گروه «چاق - کنترل» ارائه شده است؛ در گروه «چاق - کنترل»، Log2 fold changes برابر با ۰/۰۰ در نظر گرفته شده است؛ در این مقیاس، هر ۱ واحد افزایش/کاهش نسبت به عدد صفر، مساوی با ۲ برابر محاسبه می‌گردد. مقادیر مثبت، افزایش بیان و مقادیر منفی، کاهش بیان نسبت به گروه «چاق - کنترل» را نشان می‌دهد.

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که چاقی ناشی از رژیم غذایی پرچرب، الگوی بیان ژن‌های متابولیک کبدی را به‌طور معنی‌داری دچار اختلال می‌کند؛ به‌گونه‌ای که منجر به کاهش معنی‌دار GLUT4 و KLF15 از یک سو و افزایش SREBP-1c و LXR α از سوی دیگر می‌گردد. این الگوی تغییرات بیان ژنی در بافت کبد، تصویر مولکولی روشنی از وضعیت مقاومت به انسولین کبدی و لیپوژنز افزایش‌یافته در مدل چاقی ناشی از رژیم پرچرب ارائه می‌دهد. در همین زمینه، کاهش بیان GLUT4 در کبد موش‌های چاق در مطالعه حاضر، می‌تواند به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مولکولی کاهش برداشت گلوکز وابسته به انسولین در کبد و به‌دنبال آن، افزایش گلوکونئوز و تشدید هایپرگلیسمی تفسیر شود. از طرفی، کاهش معنی‌دار KLF15 در کبد موش‌های چاق نیز نشان از آن دارد که در شرایط چاقی، سرکوب KLF15 کبدی ممکن است بخشی از یک برنامه تطابقی ناموفق برای مقابله با اضافه‌بار کالری باشد که در نهایت به اختلال در تولید گلوکز و مقاومت به انسولین منجر می‌شود (۵). در مقابل، افزایش معنی‌دار بیان SREBP-1c و LXR α در کبد موش‌های چاق، کاملاً با انتظارات فیزیولوژیک همخوانی دارد و مؤید موفقیت مدل چاقی در القای کبد چرب غیرالکلی است. افزایش هماهنگ این دو ژن، یک چرخه تقویت‌کننده مثبت برای لیپوژنز کبدی ایجاد می‌کند که محرک اصلی استئاتوز در کبد چرب مرتبط با چاقی است (۶).

اثر بخشی قوی و مستقل MIIT در افزایش معنی‌دار GLUT4 و KLF15 و کاهش SREBP-1c و LXR α در کبد، یکی دیگر از یافته‌های برجسته این مطالعه است. بررسی‌های اندازه اثر نشان می‌دهد که اثر جداگانه MIIT در قیاس با اثر جداگانه بتائین در افزایش بیان ژن‌های GLUT4 و KLF15 و کاهش LXR α به مراتب بیشتر است. اگرچه آثار تمرینات تناوبی با شدت‌های مختلف بر بافت چربی و عضله به‌خوبی مستند شده است؛ در همین راستا، فرح نیا و دیگران (۲۰۲۴) نشان دادند که هشت هفته HIIT در موش‌های چاق مبتلا به NAFLD می‌تواند سطوح کبدی SREBP1c را کاهش دهد (۲۲). رحمی^۱ و دیگران (۲۰۲۱) نیز در مطالعه‌ای با هدف بررسی تاثیر هشت هفته تمرین تداومی با شدت بالا و متوسط بر بیان GLUT4 در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو، افزایش بیان GLUT4 را در هر دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل نشان دادند (۲۳). امیری و دیگران (۲۰۲۱) تاثیر ۱۲ هفته تمرین تداومی با شدت متوسط را بر سطوح KLF-3 و KLF-15 در بافت چربی احشایی موش‌های چاق مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند که این نوع تمرینات، در افزایش معنی‌دار شاخص‌های مذکور در چاقی موثر هستند.

¹ Rahmi



(۲۴). هم‌چنین نجفی و دیگران (۲۰۱۸) به بررسی تاثیر هشت هفته HIIT و تمرین تداومی با شدت متوسط^۱ (MICT) بر میزان GLUT4 عضله اسکلتی موش‌های چاق پرداختند؛ نتایج نشان داد که هر دو نوع تمرین ورزشی باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن GLUT4 در این نمونه‌ها می‌گردد (۲۵).

مکانیسم‌های احتمالی اثرات تمرین تناوبی بر ژن‌های مورد مطالعه را می‌توان در دو سطح تبیین کرد: ۱- انقباضات عضلانی در طول تمرین، منجر به ترشح مایوکاین‌هایی نظیر آیریزین^۲ و اینترلوکین-۶^۳ می‌شود که از طریق جریان خون به کبد رسیده و با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ وابسته به AMPK و انتقال‌دهنده سیگنال و فعال‌کننده رونویسی-۴^۴ (STAT3)، بیان ژن‌های گلوکونوژن و لیپوژن را تعدیل می‌کنند (۲۶). ۲- کاهش نسبت انسولین به گلوکاگون و افزایش آدیپونکتین متعاقب تمرین، از طریق آبخار سیگنالینگ گیرنده سوپرسترای انسولین-۵^۵ (IRS-2) / فسفواپینوزیتید ۳-کیناز^۶ Akt/(PI3K) و فعال‌سازی عوامل رونویسی جعبه سرچنگالی FOXO1^۷ و گیرنده فعال‌شونده توسط تکثیرکننده پراکسیزومی آلفا^۸ (PPARα)، به‌طور مستقیم بر رونویسی ژن‌های هدف در کبد اثر می‌گذارند (۲۷). افزایش GLUT4 کبدی توسط MIIT در مطالعه ما، می‌تواند ناشی از فعال‌سازی مسیر AMPK و به‌دنبال آن افزایش جابه‌جایی و رونویسی GLUT4 باشد. هم‌چنین کاهش SREBP-1c و LXRα احتمالاً از طریق فسفریلاسیون و غیرفعال‌سازی SREBP-1c وابسته به AMPK و نیز کاهش لیگاندهای درون‌زای LXRα به‌دنبال کاهش محتوای لیپیدی کبد میانجی‌گری می‌شود (۲۸). این یافته‌ها، کبد را به‌عنوان یک بافت هدف کلیدی برای اثرات متابولیکی MIIT معرفی می‌کند.

اثرات تعدیل‌کننده قوی و مستقل بتائین نانومولسیون‌شده در این تحقیق بر بیان تمامی ژن‌های هدف، دومین یافته پژوهشی مهم است. بتائین پیش‌تر در مطالعات متعدد اثرات محافظتی خود را بر کبد نشان داده اما نوآوری مطالعه حاضر در استفاده از فرمولاسیون نانومولسیون با توجه به عبور بهتر از سد گوارشی و تسهیل جذب از طریق مسیرهای انتقال غشایی سلولی و خارج سلولی و ارزیابی اثرات آن در سطح بیان ژن‌های کلیدی متابولیک است. اگرچه مطالعه حاضر به‌طور مستقیم فراهمی زیستی بتائین نانومولسیون‌شده را با بتائین معمولی مقایسه نکرده است، اما دوز مؤثر ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم که نسبت به بسیاری از مطالعات پیشین با بتائین معمولی (معمولاً ۵۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به‌طور چشمگیری کمتر است، به‌صورت غیرمستقیم از افزایش کارایی و فراهمی زیستی این فرمولاسیون حمایت می‌کند. در این زمینه، اصفهانی و دیگران (۲۰۲۳) به بررسی اثرات چهار هفته مکمل‌یاری با بتائین در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر دیابت و سمیت کبدی ناشی از سدیم آرسنیک در موش سوری پرداختند. در تحقیق مذکور، آرسنیک با مهار بیان GLUT4، موجب مقاومت به انسولین، عدم تحمل گلوکز و آسیب اکسیداتیو و التهابی کبد شد و تجویز بتائین، از طریق افزایش بیان GLUT4، از سمیت کبدی و عدم تحمل گلوکز ناشی از آرسنیک جلوگیری کرده و از کبد در برابر آسیب اکسایشی ناشی از التهاب محافظت کرد (۲۹). جین^۹ و دیگران (۲۰۲۱) نیز گزارش کردند که تجویز هشت هفته‌ای بتائین در ماهی‌های سیاه دارای رژیم غذایی پرچرب، توانست تجمع قطرات چربی واکوئولی، بیان ژن و پروتئین سیرتوئین-۱^{۱۰}، بیان ژن و محتوای پروتئین PPARα و بیان ژن و محتوای پروتئین SREBP-1c را کاهش دهد (۳۰). هم‌چنین یانگ^{۱۱} و دیگران (۲۰۱۷) نشان دادند که تجویز بتائین، تغییرات ساختاری ناشی از الکل در سلول‌های

¹ Medium-intensity continous training

² Irisin

³ Interleukin-6

⁴ Signal transducer and activator of transcription 3

⁵ Insulin receptor substrate-2

⁶ Phosphoinositide 3-kinase

⁷ Forkhead box O1

⁸ Peroxisome proliferator-activated receptor alpha

⁹ Jin

¹⁰ Sirtuin-1

¹¹ Yang



کبدی موش‌های مبتلا به کبد چرب، از جمله تجمع قطرات چربی و میتوکندری‌های متورم، افزایش آنزیم‌های اسید چرب سنتتاز، SREBP-1c و تنظیم منفی PGC-1 α را بهبود بخشید (۳۱).

مکانیسم‌های مولکولی اثر مستقل بتائین بر بیان ژن‌های کبدی چندوجهی است؛ بتائین با اهدای گروه متیل به هموسیستئین و تبدیل آن به متیونین، چرخه متیونین-هموسیستئین را تسهیل می‌کند. این فرایند با تأمین اس-آدنوزیل متیونین^۱ به‌عنوان دهنده اصلی گروه متیل برای متیلاسیون DNA و هیستون‌ها، منجر به تغییرات اپی‌ژنتیکی در پروموتور^۲ ژن‌های هدف می‌شود (۱۱). افزایش متیلاسیون پروموتور SREBP-1c و کاهش متیلاسیون پروموتور GLUT4 می‌تواند توجیه‌کننده اثرات مشاهده‌شده در مطالعه حاضر باشد. هم‌چنین بتائین با تجمع در شبکه آندوپلاسمی و کاهش استرس اسمزی، از فعال‌سازی مسیر استرس شبکه آندوپلاسمی و مسیرهای لیپوژنیک وابسته به آن (شامل فعال‌سازی SREBP-1c) جلوگیری می‌کند (۱۲). به‌علاوه، شواهد اخیر نشان می‌دهد بتائین می‌تواند از طریق افزایش نسبت AMP/ATP، AMPK را فعال کرده و از این طریق نیز به سرکوب SREBP-1c و تحریک اکسیداسیون اسیدهای چرب کمک کند (۳۲).

یافته نهایی و جالب‌توجه این مطالعه، عدم وجود اثر تعاملی معنی‌دار بین MIIT و بتائین برای سه ژن GLUT4، KLF15 و LXR α بود. این یافته، فرضیه جایگزین مطالعه را تأیید می‌کند که بر اساس آن، MIIT و بتائین از مسیرهای نهایی مشترکی برای اعمال اثرات خود بر این ژن‌ها استفاده می‌کنند و ترکیب آن‌ها نمی‌تواند پاسخ را فراتر از سقف فیزیولوژیک افزایش دهد. چند تبیین مکانیسمی برای این پدیده قابل طرح است: ۱- همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد، هر دو مداخله MIIT (از طریق افزایش نیاز انرژی و کاهش ATP) و بتائین (از طریق تغییر نسبت AMP/ATP) مسیر AMPK را فعال می‌کنند (۲۶، ۳۲). فعال‌سازی AMPK به‌عنوان یک مبدل متابولیک مرکزی، به‌طور هم‌افزا بر افزایش GLUT4 و کاهش SREBP-1c اثر می‌گذارد (۲۸). هنگامی که MIIT به‌تنهایی مسیر AMPK را تا حداکثر ظرفیت فیزیولوژیک فعال کرده باشد، افزودن بتائین نمی‌تواند فعال‌سازی بیشتری القا کند؛ ۲- حداکثر القای رونویسی GLUT4 و KLF15 و حداکثر سرکوب رونویسی LXR α احتمالاً توسط MIIT به‌تنهایی حاصل شده است (۲۸)؛ در همین زمینه، بررسی اندازه‌های اثر در پژوهش ما نیز نشان داده است که اندازه اثر مستقل MIIT در مقایسه با اندازه اثر مستقل بتائین در افزایش GLUT4 و KLF15 و سرکوب LXR α به مراتب بیشتر است. در این شرایط، زیربنای رونویسی و عوامل دخیل در تنظیم این ژن‌ها به وضعیت اشباع می‌رسند و مداخله دوم نمی‌تواند اثری افزایشی داشته باشد. ۳- علاوه بر این، ممکن است MIIT و بتائین در پنجره‌های زمانی متفاوتی اثر خود را اعمال کنند. نمونه‌برداری ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، برای ثبت اثرات مزمن تمرین مناسب است، اما ممکن است با اوج اثر اپی‌ژنتیکی بتائین هم‌زمان نباشد. هر چند که این یافته از نظر کاربردی نیز حائز اهمیت است؛ در شرایطی که اجرای همزمان دو مداخله دشوار یا پرهزینه است، می‌توان با اجرای تنها یکی از آن‌ها به حداکثر اثر قابل دستیابی بر این ژن‌ها نائل شد.

استثنای قابل تأمل این مطالعه، اثر تعاملی معنی‌دار و سینرژیستی MIIT و بتائین بر کاهش ژن SREBP-1c بود. این یافته نشان می‌دهد که برخلاف سایر ژن‌ها، مسیرهای سیگنالینگ این دو مداخله برای سرکوب SREBP-1c مکمل و غیرهم‌پوشان هستند. از طرفی با توجه به این که اندازه اثر مستقل MIIT در کاهش عامل بالادست SREBP-1c، یعنی LXR α بیشتر از اندازه اثر بتائین خالی بر شاخص مذکور بود و در مقابل، اندازه اثر مستقل بتائین بر کاهش مستقیم SREBP-1c نسبت به MIIT تا حدی بیشتر بود، می‌توان این‌گونه تفسیر نمود که هر دو مداخله در کنار هم، با اثری بالقوه بر عامل بالادستی SREBP-1c و اثر مستقیم بر خود آن، تأثیر سینرژیستیک ایجاد می‌کنند. از منظر مکانیسم در سطح سلولی، SREBP-1c در مقایسه با سه ژن دیگر، پیچیده‌ترین شبکه تنظیمی را دارد و تحت کنترل همزمان عوامل رونویسی (مانند LXR α و ChREBP)، تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیک (متیلاسیون پروموتور، استیلاسیون هیستون‌ها) و تنظیم‌کننده‌های پساترجمه‌ای (پروتئولیز، فسفوریلاسیون) قرار

¹ S-adenosyl methionine

² Promoter



دارد (۳۳). احتمالاً MIIT و بتائین حلقه‌های متفاوتی از این شبکه را هدف قرار می‌دهند؛ MIIT از طریق فعال‌سازی AMPK و فسفوریلاسیون SREBP-1c، مانع از ورود آن به هسته و کاهش رونویسی ژن‌های هدف می‌شود؛ همچنین تمرین با کاهش بیان LXR α ، یکی از مهم‌ترین فعال‌کننده‌های رونویسی SREBP-1c را سرکوب می‌کند (۲۸). بتائین از طریق افزایش متیلاسیون پروموتور SREBP-1c، مستقیماً دسترسی رونویسی به این ژن را محدود می‌کند و همچنین با کاهش استرس شبکه آندوپلاسمی، از فعال‌سازی پروتئولیتیک SREBP-1c جلوگیری می‌نماید (۳۱). ترکیب این دو مکانیسم مکمل (سرکوب رونویسی وابسته به LXR α توسط MIIT و خاموش‌سازی اپی‌ژنتیک پروموتور توسط بتائین) می‌تواند توضیح‌دهنده اثر سینرژیستی مشاهده‌شده باشد.

اگرچه بیان ژن به‌عنوان یک شاخص حساس و زود هنگام از پاسخ سلولی به مداخلات محسوب می‌شود، اما همبستگی کامل با سطح پروتئین عملکردی ندارد؛ لذا اندازه‌گیری پروتئین GLUT4، فرم بالغ SREBP-1c هسته‌ای و میزان فسفوریلاسیون AMPK می‌توانست یافته‌های ما را تقویت کند که از محدودیت‌های این تحقیق به‌شمار می‌رود. همچنین از آنجا که چاقی یک اختلال سیستمیک است و مداخلات تمرینی و بتائین احتمالاً اثرات مهمی بر عضله و بافت چربی نیز دارند، نتیجه‌گیری در مورد برتری یا عدم برتری ترکیب مداخلات، نیازمند بررسی همزمان این بافت‌ها نیز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: اجرای مداخلات MIIT و بتائین نانوامولسیون‌شده هر یک به‌طور مستقل الگوی بیان ژن‌های متابولیک کبدی را در جهت بهبود مقاومت به انسولین و کاهش لیپوژنز تعدیل می‌کنند؛ اما تعامل این دو مداخله اثر سینرژیستی بر ژن‌های هدف این مطالعه ندارد و فقط سبب سرکوب معنی‌دار SREBP-1c می‌شود که می‌تواند تا حدی در کاهش لیپوژنز کبدی و بهبود کبد چرب مرتبط با چاقی کمک‌کننده باشد. با توجه به این یافته‌ها، از منظر کاربردی، به‌منظور هدف‌گیری همزمان افزایش حساسیت به انسولین و کاهش لیپوژنز کبدی، اجرای تنها یکی از این مداخلات (با توجه به هزینه، دسترسی و ویژگی‌های فردی بیمار) می‌تواند کافی باشد. تأیید این یافته‌ها در مطالعات بالینی آینده می‌تواند افق‌های تازه‌ای را در درمان غیردارویی این بیماری رو به گسترش بگشاید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منفعتی در رابطه با انتشار این مطالعه وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

این مقاله بر اساس پایان نامه دکتری تخصصی که در دانشگاه آزاد اسلامی ثبت شده است، می‌باشد. هزینه‌های مطالعه بر عهده محقق بوده و نویسنده همچنین از آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد واحد کرج بخاطر همکاری صمیمانه تشکر می‌کند.

منابع

1. Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. Clinical Medicine. 2018;18(3):245-250. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245>
2. He B, Copps KD, Stöhr O, Liu B, Hu S, Joshi S, Haigis MC, White MF, Zhu H, Tao R. Spatial regulation of glucose and lipid metabolism by hepatic insulin signaling. Cell Metabolism. 2025;37(7):1568-1583. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2025.03.015>
3. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. Nature. 2001;409(6821):729-733. <https://doi.org/10.1038/35055575>



4. Drobiova H, Alhamar G, Ahmad R, Al-Mulla F, Al Madhoun A. GLUT4 trafficking and storage vesicles: Molecular architecture, regulatory networks, and their disruption in insulin resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26(15):7568. <https://doi.org/10.3390/ijms26157568>
5. Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, et al. Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes*. 2010;59(7):1608-1615. <https://doi.org/10.2337/db09-1679>
6. Stoeckman AK, Towle HC. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(30):27029-27035. <https://doi.org/10.1074/jbc.m202638200>
7. Maaloul R, Dhia IB, Marzougui H, Turki M, Kacem F, Makhlof R, Amar M, Kallel C, Dries T, Elleuch M, Ayadi F. Is moderate-intensity interval training more tolerable than high-intensity interval training in adults with obesity? *Biology of Sport*. 2023;40(4):1159-1167. <https://doi.org/10.5114/biolsport.2023.123323>
8. Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC-1 α in inflammation and chronic disease. *Nature*. 2008;454(7203):463-469. <https://doi.org/10.1038/nature07206>
9. Guarnieri RS, Oliveira GS, Ferreira KM, Penna-de-Carvalho A, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S. Persistence of the hepatic benefits of high-intensity interval training during detraining despite body weight regain in mice. *PLOS One*. 2026;21(2):e0342671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0342671>
10. Khoramipour K, Hosseini NS, Hill JW, Khoramipour K, Khoramipour K, Maroto Izquierdo S, Lista S, Saheli M. High-intensity interval training attenuates insulin resistance in diabetic rats accompanied by improvements in liver metabolism and spexin signaling. *Scientific Reports*. 2025;15:30682. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-15432-8>
11. Du J, Shen L, Tan Z, Zhang P, Zhao X, Xu Y, Gan M, Yang Q, Ma J, Jiang AA, Tang G. Betaine supplementation enhances lipid metabolism and improves insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*. 2018;10(2):131. <https://doi.org/10.3390/nu10020131>
12. Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1488-1499. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00276-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00276-2)
13. Al-Garadi MA, Suliman GM, Hussein EO, Al-Owaimer AN, Swelum AA, Almalamh NA, Alhotan RA, Qaid MM. Synergistic and individual actions of nanoemulsified vegetable oil and betaine as natural growth promoters on broiler performance, serum proteins, lipid profile, and safety enzymes. *PLOS One*. 2025;20(10):e0333285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0333285>
14. 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 and creatinine levels, and lipid profile of obese mice. *Journal of Practical Studies in Biosciences and Sport*. 2026;14(37):86-103. https://jpsbs.birjand.ac.ir/article_3420.html?lang=en [In Persian]
15. 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):2439-2449. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2022.08.012>
16. Abdelmegeed MA, Banerjee A, Yoo SH, Jang S, Gonzalez FJ, Song BJ. Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high-fat-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*. 2012;57(4):860-866. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.05.019>
17. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal of Experimental Pathology*. 2006;87(1):1-16. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>
18. Syahputra M, Lindarto D, Ramayani OR, Machrina Y, Purba A, Putra IB, et al. Effect of moderate-intensity continuous training and slow-type interval training on gene expression of TGF- β in a type 2 diabetes mellitus model of Wistar rats. *Medical Archives*. 2023;77(1):4-7. <https://doi.org/10.5455/medarh.2023.77.4-7>



19. Chen W, Zhang X, Xu M, Jiang L, Zhou M, Liu W, Chen Z, Wang Y, Zou Q, Wang L. Betaine prevented high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease by regulating the FGF10/AMPK signaling pathway in ApoE^{-/-} mice. *European Journal of Nutrition*. 2021;60:1655-1668. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02362-6>
20. Sadeghi MM, Rocky A, Dezfoulian O. Betaine attenuates fatty changes and elevates antioxidant response against oxytetracycline-induced fatty liver in rats. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2025;18(4). <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v18i4.3074>
21. 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>
22. Farah Nia M, Hosseinabadi MR, Zarei M, Soltani M. The effect of high-intensity interval training with *Portulaca oleracea* supplementation on FXR and SREBP-1c in the liver tissue of rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2024;11(1):124-138. <https://doi.org/10.22049/jahssp.2023.28954.1582> [In Persian]
23. Rahmi R, Machrina Y, Yamamoto Z. The effect of various training on the expression of the 5' AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ and glucose transporter-4 in type 2 diabetes mellitus rats. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2021;11(2):53-56. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.7913>
24. Amiri S, Tofighi A, Shirpoor A, Tolouei Azar J. The effect of 12 weeks of high-fat diet and moderate-intensity training on the KLF-15/KLF-3/furin/CTRP-12 pathway of visceral adipose tissue in male rats. *Sport Physiology and Management Investigations*. 2021;13(1):21-39. https://www.sportrc.ir/article_132579.html?lang=en [In Persian]
25. Najafi M, Asad MR, Rahimi M, Souri R, Ahvar A. The effect of exercise with different intensity on glucose transporter 4 (GLUT4) gene expression in skeletal muscle of obese male rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2018;21(4):98-108. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-5540-en.html> [In Persian]
26. Trefts E, Williams AS, Wasserman DH. Exercise and the regulation of hepatic metabolism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2015;135:203-225. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.010>
27. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, Davis KE, Bikman BT, Halberg N, Rutkowski JM, Wade MR. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nature Medicine*. 2011;17(1):55-63. <https://doi.org/10.1038/nm.2277>
28. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism*. 2011;13(4):376-388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009>
29. Esfahani PP, Mahdavinia M, Khorsandi L, Rezaei M, Nikraves H, Khodayar MJ. Betaine protects against sodium arsenite-induced diabetes and hepatotoxicity in mice. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023;30(4):10880-10889. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22941-w>
30. Jin M, Shen Y, Pan T, Zhu T, Li X, Xu F, Betancor MB, Jiao L, Tocher DR, Zhou Q. Dietary betaine mitigates hepatic steatosis and inflammation induced by a high-fat diet by modulating the Sirt1/Srebp-1/Ppar α pathway in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Frontiers in Immunology*. 2021;12:694720. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.694720>
31. Yang W, Huang L, Gao J, Wen S, Tai Y, Chen M, Huang Z, Liu R, Tang C, Li J. Betaine attenuates chronic alcohol-induced fatty liver by broadly regulating hepatic lipid metabolism. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(4):5225-5234. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7295>
32. Zhao G, He F, Wu C, Li P, Li N, Deng J, Zhu G, Ren W, Peng Y. Betaine in inflammation: Mechanistic aspects and applications. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:370622. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01070>
33. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;109(9):1125-1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>