

The combined effect of interval training with mealworm supplementation on the hepatic expression of TLR4 and NF-KB inflammatory genes and structural damage of liver tissue in rats with nonalcoholic fatty liver disease

Nader Jafari Kalhori¹, Fariba Aghaei^{2*}, Alireza Rahimi³, Foad Feizolahi²

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: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) ranges from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis, progressive fibrosis, and cirrhosis. Hepatic inflammation is central to disease progression. Toll-like receptor 4 (TLR4), activated by bacterial lipopolysaccharides and saturated fatty acids, initiates intracellular signaling through nuclear factor kappa B (NF-KB), promoting pro-inflammatory cytokine transcription, oxidative stress, hepatocyte apoptosis, and structural liver damage. Aerobic interval training can reduce hepatic fat, improve insulin sensitivity, enhance fatty-acid oxidation, and modulate inflammatory pathways. Mealworm (*Tenebrio molitor*) extract contains unsaturated fatty acids, bioactive peptides, natural antioxidants, and anti-inflammatory compounds and may reduce hepatic lipid accumulation and inflammatory signaling. Nevertheless, the combined effects of interval training and mealworm supplementation on the TLR4/NF-KB axis and liver histopathology have not been adequately examined. This study investigated the independent and combined effects of aerobic interval training and mealworm extract supplementation on hepatic TLR4 and NF-KB expression, hepatocyte fat-droplet accumulation, sinusoidal dilation, and apoptotic-cell percentage in rats with experimentally induced NAFLD.

Materials & Methods: This experimental study included 25 eight-week-old male Wistar rats (260±20 g). Sample size was estimated using G*Power for one-way analysis of variance, with a large effect size, $\alpha=0.05$, and statistical power of 0.82. Animals were housed at 20–24 °C, 45–55% humidity, and a 12:12-hour light-dark cycle with free access to water and standard food. After two weeks of adaptation, rats were randomly allocated to five groups (n=5): healthy control (HC), NAFLD, NAFLD+exercise (Exe), NAFLD+supplement (Supp), and NAFLD+exercise+supplement (Exe+Supp). NAFLD was induced over 12 weeks using a diet containing standard rodent feed plus 15% animal fat, 1% cholesterol, and 0.5% cholic acid; induction was confirmed through body weight and serum glucose, lipid-profile, ALT, and AST criteria. After treadmill familiarization and determination of a 20 m/min maximal running speed, training groups completed eight weeks of aerobic interval training, five sessions weekly, at 50–80% of maximal running speed. Each 30-minute session incorporated progressive overload and alternating work and active-recovery bouts. Supplemented groups received mealworm protein extract by morning gavage at 20 mg/kg body weight (40 mg/mL), five days weekly for eight weeks; other groups received distilled water. Forty-eight hours after the final intervention, rats were anesthetized with ketamine/xylazine, and liver tissue was collected. Hepatic TLR4 and NF-KB expression

* Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran; Email: fariba.aghaei@iau.ac.ir

was quantified by real-time PCR using GAPDH as the internal control and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Hematoxylin-eosin staining, light microscopy, and ImageJ were used to assess hepatocyte fat droplets, sinusoidal dilation, and apoptotic cells. Data were analyzed in SPSS 26 using Shapiro–Wilk, Levene, one-way ANOVA, Tukey post-hoc tests, and Cohen's d at $p \leq 0.05$.

Results: NAFLD markedly increased hepatic TLR4 and NF- κ B expression, hepatocyte fat-droplet counts, sinusoidal dilation, and apoptotic-cell percentage compared with HC. One-way ANOVA indicated significant between-group differences for every outcome ($p < 0.001$), with partial η^2 values ranging from 0.93 to 0.98. Exercise alone, mealworm supplementation alone, and their combination significantly reduced all five outcomes relative to the NAFLD group ($p < 0.001$), with large or very large pairwise effects. The independent interventions produced broadly similar reductions in inflammatory-gene expression: TLR4 decreased by 72.7% with exercise and 73.5% with supplementation, whereas NF- κ B decreased by 68.8% and 70.9%, respectively. The combined intervention produced the greatest improvements in every outcome, reducing TLR4 by 96.3%, NF- κ B by 92.8%, fat droplets by 66.6%, sinusoidal dilation by 66.5%, and apoptotic cells by 55.8%. TLR4 and NF- κ B returned significantly close to HC levels, reaching 98.7% and 97.6% recovery, respectively. Combined treatment was also significantly superior to both single interventions for all outcomes. The complete Tukey comparison is presented below.

Table 1. Supplementary analysis of Tukey test results for between-group differences versus the NAFLD group and percentage changes

Variable	Comparison group	Mean difference	p	Change vs NAFLD (%)	Cohen's d	Recovery to HC (%)
TLR4 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Exe	-0.727	<0.001*	-72.7	14.1	74.5
	Supp	-0.736	<0.001*	-73.5	13.8	75.3
	Exe+Supp	-0.965	<0.001*	-96.3 ^b	19.2	98.7 ^{a, c}
NF- κ B ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Exe	-0.688	<0.001*	-68.8	12.4	72.5
	Supp	-0.709	<0.001*	-70.9	11.9	74.6
	Exe+Supp	-0.928	<0.001*	-92.8 ^b	17.6	97.6 ^{a, c}
Hepatocyte fat droplets (per section)	Exe	-13.03	<0.001*	-26.7	2.7	33.7
	Supp	-11.09	<0.001*	-22.7	2.3	28.6
	Exe+Supp	-32.50	<0.001*	-66.6 ^b	6.8	84.0 ^a
Sinusoidal dilation (μ m)	Exe	-18.71	<0.001*	-38.0	3.7	48.6
	Supp	-16.64	<0.001*	-33.8	3.3	43.2
	Exe+Supp	-32.76	<0.001*	-66.5 ^b	6.5	85.1 ^a
Apoptotic cells (%)	Exe	-4.90	<0.001*	-23.1	2.4	31.1
	Supp	-5.24	<0.001*	-24.7	2.6	33.2
	Exe+Supp	-11.82	<0.001*	-55.8 ^b	5.9	74.9 ^a

*Significant difference from NAFLD ($p \leq 0.05$); ^a highest recovery toward HC among interventions; ^b greatest change versus NAFLD;

^c significant return to the HC level ($p \leq 0.05$). TLR4: Toll-like receptor 4; NF- κ B: Nuclear factor kappa-B.

Conclusion: Aerobic interval training and mealworm extract supplementation independently reduced hepatic TLR4 and NF- κ B expression and improved fat-droplet accumulation, sinusoidal dilation, and hepatocyte apoptosis in rats with NAFLD. Their separate effects were generally comparable, supporting the independent potential of each intervention. However, combining training with supplementation produced significantly greater reductions than either intervention alone and restored inflammatory-gene expression to levels very close to healthy controls. Mechanistically,

interval training may activate AMPK and CPT-1-dependent mitochondrial fatty-acid oxidation, reducing hepatic lipotoxicity, saturated-fatty-acid/DAMP stimulation of TLR4, ROS generation, IKK β activity, IKB degradation, and NF-KB nuclear translocation. Mealworm bioactive peptides and phenolic compounds may inhibit TLR4/MD-2 dimerization and downstream MyD88/TRIF/NF-KB signaling, while chitin may improve gut-barrier integrity and limit circulating LPS; antioxidant peptides may additionally attenuate ROS- and cytochrome-c-mediated apoptosis. Their combination may therefore provide complementary metabolic and inflammatory blockade, reinforced by mealworm PUFA-mediated PPAR- α/γ activation, thereby reducing lipogenesis, increasing lipid oxidation, and more effectively restoring hepatic structure. Thus, combined aerobic interval training and mealworm supplementation may represent a promising non-pharmacological strategy for NAFLD; however, because this investigation used an animal model, its findings cannot be generalized directly to human populations.

Keywords: NAFLD, Inflammation, Exercise, Mealworm, Apoptosis.

Ethical Considerations: Animal welfare was observed.

Compliance with Ethical Guideline: Conducted under ARRIVE guidelines and Islamic Azad University ethics requirements.

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.



اثر ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل یاری کرم آرد بر بیان کبدی ژن های التهابی TLR4 و NF-KB و آسیب های ساختاری بافت کبد موش های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

نادر جعفری کلهری^۱، فریبا آقایی^{۲*}، علیرضا رحیمی^۳، فؤاد فیض الهی^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: التهاب کبدی در NAFLD نقش محوری در فعال سازی مسیر گیرنده شبه گذرگاهی-۴ (TLR4)/عامل هسته ای کاپا-B (NF-KB) دارد که با ترشح سایتوکاین های پیش التهابی، تشدید استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوز همراه است. خط اول درمان NAFLD مداخله در سبک زندگی از جمله رژیم غذایی و فعالیت ورزشی است. لذا هدف این تحقیق بررسی اثر ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل یاری کرم آرد بر بیان کبدی ژن های التهابی TLR4 و NF-KB و آسیب های ساختاری بافت کبد موش های مبتلا به NAFLD می باشد. **روش تحقیق:** ۲۵ سر موش صحرایی شامل پنج سر موش در هر گروه به پنج گروه کنترل سالم، مدل NAFLD، مدل+تمرین، مدل+مکمل، مدل+تمرین+مکمل تقسیم شدند. مدل سازی NAFLD، با رژیم غذایی پرچرب، کلسترول و اسیدکولیک انجام شد. پروتکل تمرین هوازی تناوبی به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته با شدت ۵۰ تا ۸۰٪ حداکثر سرعت دویدن، در مجموع ۳۰ دقیقه همراه با اضافه بار اجرا شد؛ گاوژ مکمل کرم آرد، با دوز ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن صورت گرفت. اندازه گیری بیان کبدی ژن های TLR4 و NF-KB به روش Real-Time PCR، تجمع قطرات چربی در کبد، اتساع سینوزوئیدها و درصد آپوپتوز با رنگ آمیزی بافتی هماتوکسیلین-ئوزین صورت گرفت. داده ها از طریق آزمون های تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی در $p \leq 0.05$ تحلیل شدند. **یافته ها:** القاء NAFLD، منجر به افزایش بیان کبدی TLR4 و NF-KB، تجمع قطرات چربی، اتساع سینوزوئیدها و درصد آپوپتوز در بافت کبد شد. تمرین هوازی، مکمل کرم آرد و ترکیب هر دو مداخله باعث کاهش سطوح تمام شاخص های مطالعه در مقایسه با گروه مدل NAFLD گردید ($p \leq 0.001$). ترکیب تمرین و مکمل در مقایسه با هر یک از مداخلات مستقل توانست بیان TLR4 (۹۸/۷٪) و NF-KB (۹۷/۶٪) را به سطوح پایه سالم بازگرداند. **نتیجه گیری:** ترکیب تمرین هوازی و کرم آرد با ایجاد تغییرات مثبت بر محور التهاب کبدی NF-KB/TLR4 و تعدیل متابولیسم چربی، شاید بتواند در درمان NAFLD موثرتر از هر یک از مداخلات مستقل واقع شود.

واژه های کلیدی: التهاب، بافت کبد، تمرین هوازی، لارو خوراکی.

* آدرس نویسنده مسئول: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه فیزیولوژی ورزش؛ پست الکترونیک: fariba.aghaei@iau.ac.ir

The combined effect of interval training with mealworm supplementation on the hepatic expression of TLR4 and NF-KB inflammatory genes and structural damage of liver tissue in rats with nonalcoholic fatty liver disease

Nader Jafari Kalhori¹, Fariba Aghaei^{2*}, Alireza Rahimi³, Foad Feizolahi²

1. PhD 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: Hepatic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) plays a pivotal role in the activation of the toll-like receptor-4 (TLR4)/nuclear factor kappa-B (NF- κ B) pathway, which is associated with the secretion of proinflammatory cytokines, exacerbation of oxidative stress, and induction of apoptosis. The first line of treatment for NAFLD is lifestyle intervention, including diet and exercise. Therefore, aim of this study was to investigate the combined effect of interval training with mealworm supplementation on the hepatic expression of inflammatory genes TLR4 and NF-KB and structural damage of liver tissue in rats with NAFLD. **Materials and Methods:** 25 rats, including five rats per group, were divided into five groups: healthy control, NAFLD model, model+exercise, model+supplement, and model+exercise+supplement. NAFLD modeling was performed with high-fat, cholesterol, and cholic-acid diet. The interval aerobic training was performed for eight weeks, five sessions per week at intensity of 50 to 80% of maximum running speed, for total of 30 minutes with overload; gavage of mealworm extract supplement was performed at dose of 20 mg/kg bodyweight. Hepatic expression of TLR4 and NF-KB genes was measured by Real-Time-PCR, accumulation of fat droplets in liver, sinusoidal expansion, and percentage of apoptosis by hematoxylin-eosin tissue staining. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests at $p \leq 0.05$. **Results:** Induction of NAFLD led to increase in hepatic expression of TLR4 and NF-KB, accumulation of fat droplets, sinusoidal expansion, and percentage of apoptosis in liver tissue. Aerobic training, mealworm supplementation, and the combination of both interventions reduced the levels of all study indicators compared to NAFLD model group ($p \leq 0.001$). The combination of exercise and supplementation was able to restore TLR4 (98.7%) and NF-KB (97.6%) expression to healthy baseline compared to each of the independent interventions. **Conclusion:** The combination of aerobic training and mealworm, by creating positive changes in TLR4/NF-KB hepatic inflammation axis and modulating lipid metabolism, maybe more effective in treatment of NAFLD than either of the independent interventions.

Keywords: Inflammation, Liver Tissue, Aerobic Exercise, Edible Larvae

*Corresponding Author Address: Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran;
Email: fariba.aghaei@iaui.ac.ir



بیماری کبد چرب غیر الکلی^۱ (NAFLD)، یکی از شایع ترین اختلالات متابولیک کبدی در سطح جهان است که طیفی از استئاتوز ساده تا استئاتوهپاتیت غیرالکلی^۲ (NASH)، فیبروز پیشرونده و سیروز را در بر می گیرد (۱). پاتوژنز و پیشرفت NAFLD تحت تأثیر مکانیسم های پیچیده ای از جمله مقاومت به انسولین، لیپوتوکسیسیته، استرس اکسیداتیو و به ویژه التهاب قرار دارد که در فرضیه «چند عاملی» به عنوان عوامل کلیدی پیشرفت بیماری شناخته شده اند (۲). نقش التهاب کبدی در تبدیل استئاتوز به NASH و تشدید آسیب هپاتوسلولی به گونه ای است که فعال سازی مسیرهای سیگنالینگ التهابی نظیر گیرنده شبه-گذرگاهی^۳ (TLR4) و عامل هسته ای کاپا- β (NF- κ B) با ترشح سایتوکاین های پیش التهابی، تشدید استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوز را همراه می کند. این فرآیندهای التهابی منجر به آسیب های ساختاری مشخصی در بافت کبد از جمله تورم بالونی هپاتوسیت ها، نکروز سلولی، تجمع ماتریکس خارج سلولی و فیبروز می شود که زمینه ساز پیشرفت NAFLD به مراحل پیشرفته تر و حتی کارسینومای هپاتوسلولی است (۳).

طی این مسیر سیگنالینگ، TLR4، با تشخیص لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی و اسیدهای چرب اشباع شده، آبشار سیگنالینگ داخل سلولی را از طریق فعال سازی NF- κ B آغاز می کند. فعال سازی NF- κ B منجر به رونویسی ژن های پیش التهابی از جمله عامل نکروز تومور-آلفا^۴ (TNF- α)، اینترلوکین-۶^۵ (IL-6) و اینترلوکین-۱^۶ (IL-1 β) می شود که محیط التهابی کبد را تشدید می کنند (۴). مطالعات متعدد نشان داده اند که بیان افزایش یافته TLR4 و NF- κ B در بیماران مبتلا به NAFLD و مدل های حیوانی این بیماری، با شدت استئاتوز کبدی و پیشرفت به NASH همبستگی مستقیم دارد (۵). تجمع تری گلیسیرید و اسیدهای چرب آزاد در هپاتوسیت ها، از طریق استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد میتوکندری، موجب فعال سازی مداوم این مسیر سیگنالینگ می شود (۶). علاوه بر این، فعالیت مزمن محور TLR4/NF- κ B با القای بیان ژن های پیش آپوپتوزی مانند کاسپاز-۳، مرگ سلولی هپاتوسیت ها را تسریع کرده و به فیبروز کبدی منجر می شود. این یافته ها اهمیت هدف گیری درمانی این مسیر را در مدیریت NAFLD برجسته می سازد (۷).

خط اول درمان NAFLD مداخله در سبک زندگی از جمله رژیم غذایی و فعالیت ورزشی است. گزارش شده است که تمرینات ورزشی هوازی از طریق کاهش محتوای چربی کبد و استرس اکسیداتیو در هپاتوسیت ها، می تواند در کاهش التهاب کبدی، مقاومت انسولینی، استئاتوز، فیبروز و مرگ سلول های کبدی در بیماران NAFLD نقش محوری داشته باشد (۸). هم چنین تمرین هوازی به عنوان یک مداخله غیردارویی مؤثر، نقش برجسته ای در بهبود NAFLD از طریق تعدیل مسیرهای التهابی دارد. مطالعات نشان داده اند که تمرین هوازی منظم با کاهش بیان TLR4 و NF- κ B در بافت کبدی، تولید سایتوکاین های پیش التهابی را مهار کرده و محیط التهابی کبد را بهبود می بخشد (۹). این اثرات ضد التهابی با کاهش معنادار استئاتوز کبدی، کاهش آپوپتوز هپاتوسیت ها و مهار پیشرفت فیبروز همراه است (۸). شواهد فزاینده نشان می دهند که شدت تمرین نسبت به حجم آن نقش تعیین کننده تری در بهبود پاتولوژی کبدی ایفا می کند. تمرین هوازی تناوبی با ایجاد دوره های متناوب فعالیت شدید و استراحت فعال، در مقایسه با تمرینات هوازی تداومی سنتی، اثرات برتری در کاهش التهاب مزمن، تقویت دفاع آنتی اکسیدانی و بهبود استئاتوز کبدی نشان داده است. این نوع تمرین، به ویژه با افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و بهبود حساسیت انسولین، تجمع چربی در کبد را کاهش داده و از پیشرفت NAFLD به NASH جلوگیری می کند (۱۰). در ارتباط مستقیم تر با محور التهابی

¹ Non-alcoholic fatty liver disease

² Non-alcoholic steatohepatitis

³ Toll-like receptor 4

⁴ Nuclear factor kappa-B

⁵ Tumor necrosis factor-alpha

⁶ Interleukin-6

⁷ Interleukin-1 beta



TLR4/NF- κ B، ژو^۱ و دیگران در سال ۲۰۲۱ در مدل حیوانی NAFLD گزارش کردند که فعالیت بدنی از طریق افزایش ترشح ایریسین، فعال سازی کمپلکس TLR4/MD2 را مهار کرده و در نتیجه موجب کاهش التهاب کبدی شد. از آنجا که NF- κ B یکی از مهم ترین عوامل پایین دست TLR4 در پاسخ های التهابی است، این مطالعه از نقش ورزش در مهار محور TLR4/NF- κ B نیز حمایت می کند (۱۱). افزون بر این، فردریکسون^۲ و دیگران (۲۰۲۱) در موش های مبتلا به NASH نشان دادند که تمرینات پر شدت نسبت به تمرینات با شدت متوسط، کاهش بیشتری در تجمع ماکروفاژهای التهابی، لیپوژن و التهاب کبدی ایجاد می کند. این یافته ها حاکی از آن است که شدت تمرین می تواند در میزان مهار پاسخ های التهابی نقش تعیین کننده ای داشته باشد (۱۲). همچنین نوری و دیگران (۲۰۲۲) گزارش کردند که تمرینات HIIT در زنان دارای اضافه وزن و چاقی باعث کاهش بیان ژن NF- κ B شد؛ هر چند تغییرات TLR4 معنی دار نبود. این یافته ها نشان می دهد که ورزش می تواند حتی در غیاب تغییرات مستقیم در گیرنده های اولیه التهابی، مسیرهای پایین دستی التهابی را تعدیل کند (۱۳).

در کنار تعدیل رژیم غذایی در جهت درمان NAFLD، استفاده از برخی مکمل های غذایی برای کمک به درمان نیز پیشنهاد شده است. استفاده از مکمل های غذایی با منشأ طبیعی به عنوان رویکردی نوین در مدیریت NAFLD مورد توجه قرار گرفته است. کرم آرد^۳ (یا لارو *Tenebrio molitor*)، یک منبع پروتئینی غنی با ترکیب منحصربه فرد اسیدهای چرب غیراشباع، پپتیدهای زیست فعال، آنتی اکسیدان های طبیعی و ترکیبات ضد التهابی است که در سال های اخیر به عنوان یک ماده غذایی عملکردی شناخته شده است. مطالعات نشان داده اند که عصاره کرم آرد دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی بوده و می تواند از طریق مهار سیگنالینگ التهابی و کاهش بیان سایتوکاین های پیش التهابی، التهاب مزمن کبدی را تعدیل کند (۱۴). علاوه بر این، مطالعات حیوانی نشان داده اند که مصرف عصاره کرم آرد می تواند تجمع چربی کبدی، فیبروز و آسیب هپاتوسلولی را در NAFLD بهبود بخشد (۱۵). در همین زمینه، سئو^۴ و دیگران (۲۰۱۷) در مطالعه ای بر روی موش های صحرایی تحت رژیم غذایی پر چرب نشان دادند که مصرف عصاره لارو کرم آرد به مدت ۱۲ هفته منجر به کاهش معنادار تجمع چربی کبدی، کاهش بیان ژن های التهابی از جمله TNF- α و IL-6 و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کبدی گردید (۱۶). اخیراً، ون^۵ و همکاران (۲۰۲۵) نیز در مطالعه ای بر روی سلول های ماکروفاژ RAW 264.7 نشان دادند که عصاره لارو کرم آرد قادر است بیان برخی کموکاین های التهابی را از طریق مهار مسیر NF- κ B کاهش دهد و نفوذ ماکروفاژهای التهابی به بافت را محدود کند (۱۴). با این حال، مطالعات موجود عمدتاً بر اثرات مستقل عصاره کرم آرد تمرکز داشته و اثر تعاملی آن با مداخلات ورزشی، به ویژه تمرین هوازی تناوبی، بر نشانگرهای التهاب مزمن، دفاع آنتی اکسیدانی و فیبروز کبدی در NAFLD هنوز به طور کامل بررسی نشده است.

با وجود شواهد علمی مبنی بر اثرات مستقل تمرین هوازی و مکمل یاری کرم آرد بر بهبود NAFLD، خلأ دانش قابل توجهی در زمینه اثرات هم افزای این دو مداخله بر محور التهابی TLR4/NF- κ B و آسیب های ساختاری کبد وجود دارد. تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط تا بالا، از طریق بهبود حساسیت انسولین و افزایش اکسیداسیون چربی، می تواند استئاتوز کبدی را کاهش دهد (۱۰)؛ در حالی که کرم آرد با ارائه پپتیدهای زیست فعال و ترکیبات ضد التهابی، پتانسیل مهار مستقیم مسیرهای التهابی را دارد (۱۴). بنابراین، ترکیب این دو مداخله ممکن است از طریق مکانیسم های احتمالی متفاوت اما مکمل از جمله تعدیل متابولیسم و افزایش اکسیداسیون چربی و کاهش استرس اکسیداتیو، اثرات برتری نسبت به هر یک از مداخلات مستقل بر سرکوب التهاب کبدی، کاهش آپوپتوز هپاتوسیت ها و بهبود ساختار آسیب دیده کبد در NAFLD داشته باشد. نوآوری این مطالعه در ارزیابی همزمان و تعاملی اثرات تمرین هوازی تناوبی و مکمل کرم آرد بر محور التهابی TLR4/NF- κ B و آسیب های ساختاری

¹ Zhu

² Fredrickson

³ Mealworm

⁴ Seo

⁵ Won



کبد در NAFLD نهفته است که تاکنون در پیشینه علمی موجود، مورد بررسی قرار نگرفته است. شناسایی مکانیسم‌های هم‌افزایی احتمالی این دو مداخله در سرکوب التهاب کبدی و بازگرداندن شاخص‌های مولکولی و بافتی به سطوح پایه سالم، می‌تواند مبنایی علمی برای طراحی استراتژی‌های درمانی غیردارویی، مقرون‌به‌صرفه و چندوجهی در مدیریت بالینی NAFLD فراهم آورد.

روش تحقیق

نمونه‌های پژوهش: در این مطالعه که با رویکردی تجربی و بنیادی انجام شد، برای محاسبه حجم نمونه مورد نیاز و با توجه به چالش‌های موجود در برآورد انحراف معیار و اندازه اثر، استفاده از نرم‌افزارهای آماری نظیر جی پاور^۱ استفاده شد. در این نرم‌افزار، با انتخاب آزمون F و مدل آماری تحلیل واریانس، اندازه اثر بزرگ، سطح خطای آلفای ۰/۰۵، توان آماری ۰/۸۲ لحاظ شد و در نهایت ۲۵ سر موشی برای پنج گروه در نظر گرفته شد. مبنای انتخاب اندازه اثر بزرگ، یافته‌های حاصل از پژوهش‌های پیشین بود. موش‌های صحرایی بالغ نر ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزن بدن 260 ± 20 گرم از مرکز بافت و ژن پاسارگاد تهیه شدند؛ این حیوانات به مدت دو هفته در قفس‌های استاندارد شفاف از جنس پلی‌کربنات، تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد نگهداری شده و به آب و غذای استاندارد آزمایشگاهی (تولید شرکت خوراک دام پهلور) به صورت آزاد دسترسی داشتند تا با محیط جدید سازگار شوند. لازم به ذکر است کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش مطابق با دستورالعمل‌های مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی ARRIVE و نیز ضوابط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی به اجرا درآمد. این تحقیق بر پایه طرح پژوهشی رساله دکتری با کد ۱۶۲۷۷۱۶۴۲ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام پذیرفت.

روش اجرای پژوهش: موش‌های صحرایی پس از دو هفته سازگاری با محیط جدید، به صورت تصادفی به پنج گروه (۵ سر موش در هر گروه) شامل: ۱- کنترل سالم (HC)، ۲- مدل NAFLD، ۳- مدل + تمرین (Exe)، ۴- مدل + مکمل (Supp)، ۵- مدل + تمرین + مکمل (Exe+Supp) تقسیم شدند.

جهت ایجاد مدل NAFLD، گروه‌های بیمار با رژیم غذایی پرچرب، کلسترول و اسید کولیک به مدت ۱۲ هفته دچار بیماری شدند؛ 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 مطابق دستورالعمل ۱۲ هفته‌ای، شامل غذای پایه جوندگان (استاندارد) بعلاوه ۱۵٪ چربی حیوانی، ۱٪ کلسترول (شرکت سیگما-آمریکا) و ۰/۵٪ 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 (۱۷). برای اطمینان از القای کبد چرب 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 رت‌ها گرفته شد. سپس سطوح گلوکز، نیمرخ چربی شامل تری‌گلیسرید، کلسترول تام، لیپوپروتئین کم‌چگال^۲ (LDL) و لیپوپروتئین پرچگال^۳ (HDL) و آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز^۴ (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز^۵ (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، تری‌گلیسرید و کلسترول بالای ۲۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر، LDL بالای ۱۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر و HDL کمتر از ۴۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر)، تاییدی بر ابتلای

¹ G Power

² Low-density lipoprotein

³ High-density lipoprotein

⁴ Alanine aminotransferase

⁵ Aspartate aminotransferase

موش‌ها به کبد چرب بود (۱۸). هم‌چنین وزن موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب، پس از ۱۲ هفته مدل‌سازی به میانگین 400 ± 5 گرم رسید.

پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه برای گروه‌های تمرین ورزشی (پیش از دریافت رژیم غذایی پرچرب)، دو هفته و سه جلسه در هفته زمان، جهت آشنایی با پروتکل تمرین هوازی تناوبی دوییدن روی نوارگردان و تعیین شدت نسبی تمرین در نظر گرفته شد. در طول این دو هفته موش‌های گروه‌های تمرینی با دوییدن روی تردمیل 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 دوییدن (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 تردمیل به ازای هر دو دقیقه، دو متر بر دقیقه افزوده می‌شد تا موش‌ها قادر به دوییدن 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 تمرین هوازی تناوبی را مطابق با پروتکل لی^۱ و دیگران (۲۰۲۲) به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته اجرا نمودند (۱۹) (جدول ۱).

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی تناوبی

¹ Li



علوم زیستی در ورزش

مطالعات کاربردی



گروه‌ها	مدت زمان آشناسازی با پروتکل تمرینی	مجموع زمان گرم کردن و سرد کردن (دقیقه)	مدت زمان بدنه اصلی تمرین (دقیقه)	تعداد وهله‌های تمرینی در هر جلسه	نسبت کار به استراحت (W:R)	اضافه بار سرعت دویدن	شدت (حداکثر)
گروه تمرین	دو هفته	دویدن با سرعت ۵ متر/دقیقه مجموعاً به مدت ۱۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۱۰ وهله فعالیتی ۱ دقیقه‌ای (با سرعت ۱۰ متر در دقیقه در هفته اول) با تناوب‌های استراحتی ۲ دقیقه‌ای (با سرعت ۵ متر در دقیقه)	۲:۱	اعمال اضافه بار در سرعت در وهله‌های فعالیتی:	
گروه تمرین+مکمل						هفته اول، سرعت ۱۰ متر/دقیقه	۵۰ درصد
						هفته دوم، سرعت ۱۲ متر/دقیقه	۶۰ درصد
						هفته سوم، سرعت ۱۴ متر/دقیقه	۷۰ درصد
						هفته چهارم تا هشتم، سرعت ۱۶ متر/دقیقه	۸۰ درصد

موش‌ها در گروه Supp و گروه Exe+Supp، مکمل پروتئینی عصاره کرم آرد آماده را به میزان ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۴۰ میلی گرم/میلی لیتر) به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته مشابه با روزهای تمرینی در ساعات صبح به صورت گاواژ دریافت نمودند (۲۰). در گروه‌های دیگر از آب مقطر به عنوان حلال استفاده گردید.

روش‌های آزمایشگاهی: 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. 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 TLR4 و NF- κ B به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی^۱ (Real-time PCR) بررسی شد؛ استخراج ریبونوکلیک اسید^۲ (RNA) به صورت RNX-Pluse و به منظور بررسی کیفیت و کمیت آن از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بروی ژل آگارز استفاده شد. ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن‌های TLR4 و NF- κ B با استفاده از سایت NCBI استخراج شد. پرایمرها توسط نرم افزار کامپیوتری AlleleID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم افزار BLAST جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور ساخت دئوکسی نوکلئیک اسید مکمل^۳ (cDNA)، RNA استخراج شده با رندوم هگزامر و دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها^۴ (dNTPs) به هر میکروتیوب اضافه شد. به ازای هر نمونه، بافر x10، آنزیم نسخه‌بردار معکوس و مهارکننده‌ی آنزیم تجزیه‌گر RNA، اضافه شد. نمونه‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و فرایند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز اجرا شد. فرایند Real Time به صورت دو مرحله‌ای انجام شد: مرحله سنتز cDNA با استفاده از کیت هایپراسکریپت^۵ که طبق روش ذکر شده اجرا شد. مرحله تکثیر که با استفاده از مستر آماده سایبرگرین^۶ صورت گرفت. این مستر به صورت شروع سریع در دمای بالا است و برای انجام مرحله تکثیر، تنها به این مستر، پرایمرها، آب و cDNA اضافه شد. پروتکل دمایی نیز شامل یک چرخه ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس فعال سازی آنزیم شروع سریع^۷ TEMPase و به دنبال آن ۲۵-۳۵ چرخه ۱۵-۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس (ثبت انعکاس نور فلوروسنت در طول مراحل اتصال پرایمر و گسترش) و انتخاب دمای مناسب بر اساس دمای اتصال پرایمرها انجام شد. برای کمی سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر، از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ ^۸ استفاده شد. در این تحقیق از ژن گلیسرآدهید-۳ فسفات دهیدروژناز^۸ (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer Sequence
r-TLR4-F	TATAAAACATAAGGAGAGGAGG
r-TLR4-R	ATAGAAAAAGGGAAGGAAGGA
r-NF- κ B-F	AGAAGGCTGGAGAAGATGAGG
r-NF- κ B-R	TTGGTGCCTCGTGTCTTCTGT
r-GAPDH-F	GGATAGTGAGAGCAAGAGAGAGG
r-GAPDH-R	ATGGTATTGGAGAGAAGGGAGGG

¹ Real-time polymerase chain reaction

² Ribonucleic acid

³ Complementary deoxy nucleic acid

⁴ Deoxy nucleotide tri-phosphate

⁵ Hyperscript

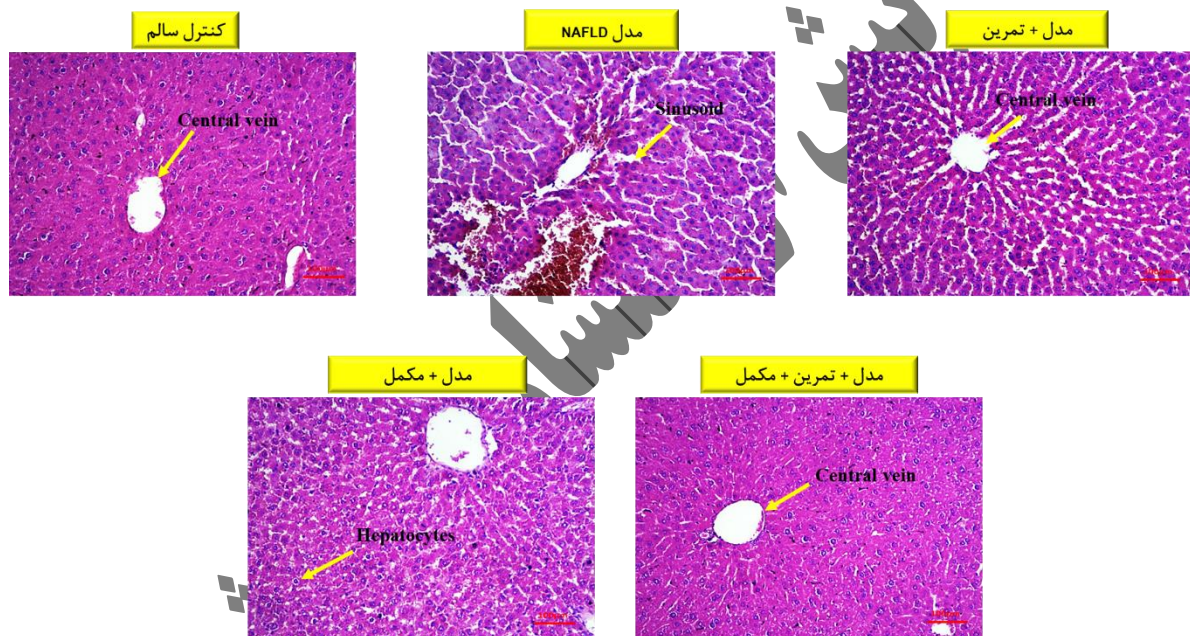
⁶ Cybergreen

⁷ Hot start

⁸ Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase



همچنین بخشی از نمونه‌های بافتی بلافاصله پس از برداشت، به منظور حفظ ساختارهای سلولی و بافتی، در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت تثبیت شدند. سپس برای انجام مراحل پردازش بافتی، نمونه‌ها ابتدا از طریق عبور تدریجی در اتانول‌های ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد آبیگری شدند تا رطوبت بافت خارج و شرایط برای نفوذ پارافین فراهم شود. پس از آن، نمونه‌ها در زایلول شفاف‌سازی شدند و در نهایت با پارافین قالب‌گیری شدند. بلوک‌های پارافینی به وسیله میکروتوم به برش‌های ۵ میکرومتری تهیه و بر روی لام‌های سیلان‌دار منتقل شدند. برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین^۱ (H & E)، لام‌ها ابتدا در فور ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند تا پارافین ذوب شود و سپس در زایلول پارافین‌زدایی شدند. بعد از آن، آبیگری معکوس با اتانول‌های نزولی انجام شد و نمونه‌ها به ترتیب با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی، در آب مقطر شست‌وشو و برای تمایز رنگی در کربنات لیتیوم قرار داده شدند؛ سپس با ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. در ادامه، آبیگری مجدد با اتانول، شفاف‌سازی نهایی با زایلول و مونت کردن با انتالن انجام شد. در پایان، بررسی مورفولوژی و ثبت تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار ایمیج جی^۲ انجام گرفت.



شکل ۱. تصاویر رنگ‌آمیزی بافتی به روش H & E در بررسی آسیب‌های ساختاری کبد

روش‌های تحلیل آماری: اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، از طریق نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ پردازش و تحلیل شدند و کلیه نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان گردیدند. ابتدا طبیعی بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون شاپیرو-ویلک^۳ و تجانس واریانس‌ها با آزمون لون^۴ مورد بررسی قرار گرفت؛ سپس جهت بررسی تفاوت‌های بین گروهی از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد؛ برای مقایسه‌های زوجی، اندازه اثر با استفاده از شاخص d کوهن^۵ و بر اساس میانگین گروه‌ها و انحراف معیار ترکیبی^۶ محاسبه شد.

¹ Hematoxylin and Eosin

² Image J

³ Shapiro-wilk

⁴ Levene

⁵ Cohen's d

⁶ Pooled standard deviation

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

جدول ۳. توصیف داده‌ها پس از مداخله به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد

Exe+Supp	Supp	Exe	NAFLD	HC	گروه‌ها
0.37 ± 0.09	0.265 ± 0.067	0.273 ± 0.060	1.001 ± 0.062	0.24 ± 0.03	TLR4 ($2^{\Delta\Delta CT}$)
0.072 ± 0.028	0.291 ± 0.076	0.311 ± 0.052	1.000 ± 0.018	0.49 ± 0.019	NF- K B ($2^{\Delta\Delta CT}$)
16.29 ± 2.61	37.70 ± 2.38	35.75 ± 2.84	48.79 ± 3.40	10.09 ± 2.10	تعداد قطرات چربی در هیپاتوسیت‌ها (به ازای هر بخش)
16.51 ± 1.85	32.63 ± 2.20	30.55 ± 1.80	49.26 ± 5.96	10.80 ± 1.91	اتساع سینوزوئیدها (میکرومتر)
9.36 ± 0.71	15.94 ± 1.35	16.28 ± 2.48	21.18 ± 1.83	5.39 ± 1.32	سلول‌های آپوپتوزی (درصد)
327.3 ± 9.9	348.5 ± 4.5	325.5 ± 6.1	399.1 ± 4.1	256.3 ± 3.8	وزن (گرم)

TLR4: گیرنده شبه گذرگاهی-۴؛ NF- K B: عامل هسته‌ای کایا- β ؛ HC: گروه کنترل سالم؛ NAFLD: گروه مدل کبد چرب؛ Exe: گروه مدل+تمرین؛ Supp: گروه مدل+مکمل؛ Exe+Supp: گروه مدل+تمرین+مکمل.

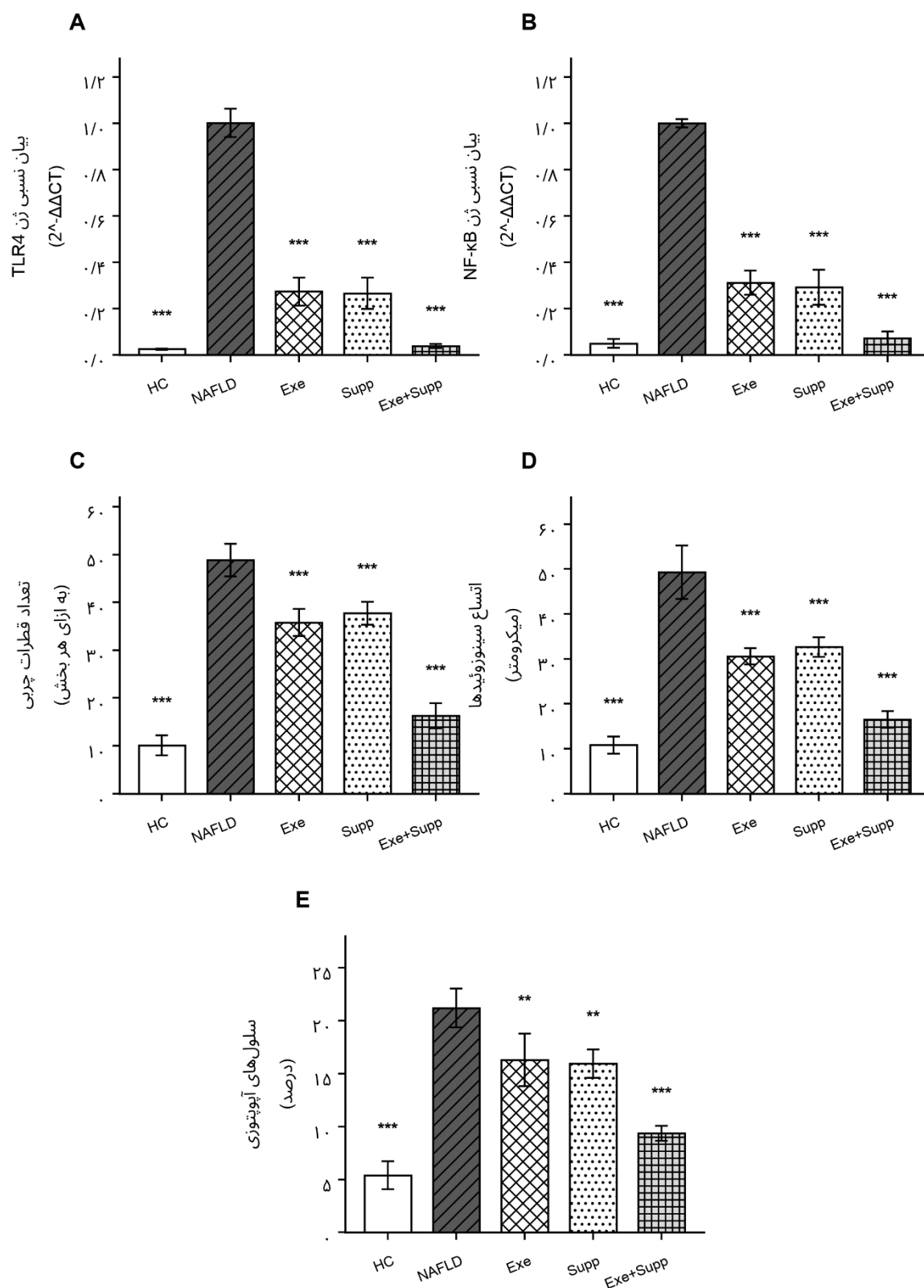
نتایج روش آماری تحلیل واریانس یک‌راهه برای تعیین وجود تفاوت‌های بین گروهی در جدول چهار و همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه دو به دو گروه‌ها در شکل یک و جدول پنج قابل مشاهده است:

جدول ۴. نتایج تحلیل واریانس یک‌راهه در بررسی وجود تفاوت‌های بین گروهی بر مبنای میانگین و انحراف استاندارد

متغیرها	F (4, 20)	p-value	اندازه اثر (η^2) (partial)
TLR4 (mRNA)	330/22	$<0.001^*$	0/985
NF- K B (mRNA)	371/38	$<0.001^*$	0/987
تعداد قطرات چربی در هیپاتوسیت‌ها	176/37	$<0.001^*$	0/972
اتساع سینوزوئیدها	111/98	$<0.001^*$	0/957
سلول‌های آپوپتوزی	71/46	$<0.001^*$	0/935

* نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی دار بین گروه‌های تحقیق در سطح $p \leq 0.05$: گیرنده شبه گذرگاهی-۴؛ NF- K B: عامل هسته‌ای کایا- β .

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه نشان داد که بین میانگین بیان ژن‌های TLR4 (اندازه اثر، $p < 0.001$ ، $F_{(4, 20)} = 330/22$)، NF- K B (اندازه اثر، $p < 0.001$ ، $F_{(4, 20)} = 371/38$)، تعداد قطرات چربی در هیپاتوسیت‌ها (اندازه اثر، $p < 0.001$ ، $F_{(4, 20)} = 176/37$)، اتساع سینوزوئیدها (اندازه اثر، $p < 0.001$ ، $F_{(4, 20)} = 111/98$) و درصد سلول‌های آپوپتوزی (اندازه اثر، $p < 0.001$ ، $F_{(4, 20)} = 71/46$) در گروه‌های مختلف تحقیق تفاوت معنی‌داری وجود دارد. به منظور بررسی منشأ تفاوت‌های بین گروهی، نتایج آزمون تعقیبی توکی در شکل یک و جدول پنج ارائه شده است:



شکل ۱. تغییرات بیان نسبی ژن‌های TLR4، NF-κB، تجمع قطرات چربی، اتساع سینوزوئیدها و درصد سلول‌های آپوپتوزی کبد در گروه‌های مختلف تحقیق در مقایسه با گروه NAFLD: * به معنای وجود اختلاف معنادار با گروه NAFLD در سطح $p \leq 0.05$; ** به معنای وجود

اختلاف معنادار با گروه NAFLD در سطح $p \leq 0/01$: *** به معنای وجود اختلاف معنادار با گروه NAFLD در سطح $p \leq 0/001$: A: بیان نسبی TLR4؛ B: بیان نسبی NF- κ B: C: تعداد قطرات چربی؛ D: اتساع سینوزوئیدها؛ E: سلول‌های آپوپتوزی. TLR4: گیرنده شبه گذرگاهی-4؛ NF- κ B: عامل هسته‌ای کاپا-B: Sinusoid Expansion: اتساع سینوزوئیدها؛ Fat Droplets: تعداد قطرات چربی؛ Apoptotic Cells: سلول‌های آپوپتوزی؛ HC: گروه کنترل سالم؛ NAFLD: گروه مدل NAFLD؛ Exe: گروه مدل+تمرین؛ Supp: گروه مدل+مکمل؛ Exe+Supp: گروه مدل+تمرین+مکمل.

یکی از پیش فرض‌های این مطالعه، تاثیر ابتلا به NAFLD بر بیان ژن‌های TLR4، NF- κ B، تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها، اتساع سینوزوئیدها و درصد سلول‌های آپوپتوزی در موش‌های مدل NAFLD بود. با توجه به شکل یک، نتایج آزمون تعقیبی نشان می‌دهد که بیان ژن‌های TLR4 (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=19/5$ ، $p=0/976$ ، اختلاف میانگین‌ها)، NF- κ B (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=18/3$ ، $p=0/951$ ، اختلاف میانگین‌ها)، تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=8/1$ ، $p=38/69$ ، اختلاف میانگین‌ها)، اتساع سینوزوئیدها (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=7/7$ ، $p=38/47$ ، اختلاف میانگین‌ها) و درصد سلول‌های آپوپتوزی (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=7/9$ ، $p=15/80$ ، اختلاف میانگین‌ها) در گروه NAFLD نسبت به گروه HC به‌طور معنی‌داری بالاتر بود.

جدول ۵. تحلیل تکمیلی نتایج آزمون توکی در بررسی تفاوت‌های بین گروه‌ها با گروه NAFLD و درصد تغییرات

متغیرها	گروه مقصد مقایسه	اختلاف میانگین‌ها	p	درصد تغییرات نسبت به گروه NAFLD	اندازه اثر (Cohen's d)	درصد بازگشت به سطوح سالم کنترل
TLR4 ($2^{\Delta\Delta CT}$)	Exe	-0/727	$<0/001^*$	-72/7	14/1	74/5
	Supp	-0/736	$<0/001^*$	-73/5	13/8	75/3
	Exe + Supp	-0/965	$<0/001^*$	-96/3 ^b	19/2	98/7 ^{a, c}
NF- κ B ($2^{\Delta\Delta CT}$)	Exe	-0/688	$<0/001^*$	-68/8	12/4	72/5
	Supp	-0/709	$<0/001^*$	-70/9	11/9	74/6
	Exe + Supp	-0/928	$<0/001^*$	-92/8 ^b	17/6	97/6 ^{a, c}
تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها (به ازای هر بخش)	Exe	-13/03	$<0/001^*$	-26/7	2/7	33/7
	Supp	-11/09	$<0/001^*$	-22/7	2/3	28/6
	Exe + Supp	-32/50	$<0/001^*$	-66/6 ^b	6/8	84/0 ^a
اتساع سینوزوئیدها (میکرومتر)	Exe	-18/71	$<0/001^*$	-38/0	3/7	48/6
	Supp	-16/64	$<0/001^*$	-33/8	3/3	43/2
	Exe + Supp	-32/76	$<0/001^*$	-66/5 ^b	6/5	85/1 ^a
سلول‌های آپوپتوزی (درصد)	Exe	-4/90	$<0/001^*$	-23/1	2/4	31/1
	Supp	-5/24	$<0/001^*$	-24/7	2/6	33/2
	Exe + Supp	-11/82	$<0/001^*$	-55/8 ^b	5/9	74/9 ^a

* نشانه اختلاف معنی دار با گروه NAFLD ($p \leq 0/05$)؛ ^a به معنای بالاترین درصد در بازگشت شاخص مورد مطالعه به سطوح HC در میان مداخلات پژوهشی؛ ^b به معنای بالاترین درصد تغییرات در شاخص مورد مطالعه در قیاس با گروه NAFLD؛ ^c به معنای بازگشت معنادار به سطح گروه HC ($p \leq 0/05$). TLR4: گیرنده شبه تول-4؛ NF- κ B: عامل هسته‌ای کاپا-B. HC: گروه کنترل سالم؛ NAFLD: گروه مدل کبد چرب؛ Exe: گروه مدل+تمرین؛ Supp: گروه مدل+مکمل؛ Exe+Supp: گروه مدل+تمرین+مکمل.



علاوه بر این، نتایج آزمون تعقیبی در بررسی اثر ترکیبی تمرین هوازی تناوبی و مکمل عصاره کرم آرد نشان داد که بیان ژن‌های TLR4 (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=4/6$ ، $p<0/001$)، NF- κ B (اختلاف میانگین‌ها)، (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=4/6$ ، $p<0/001$)، تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=4/1$ ، $p<0/001$)، اتساع سینوزوئیدها (اندازه اثر بزرگ، $d=2/8$ ، $p<0/001$)، درصد سلول‌های آپوپتوزی (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=3/4$ ، $p<0/001$)، در گروه Exe+Supp در قیاس با گروه Exe به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود.

در همین زمینه، نتایج این آزمون نشان داد که بیان ژن‌های TLR4 (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=4/5$ ، $p<0/001$)، NF- κ B (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=4/2$ ، $p<0/001$)، تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=4/5$ ، $p<0/001$)، اتساع سینوزوئیدها (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=3/2$ ، $p<0/001$)، درصد سلول‌های آپوپتوزی (اندازه اثر بسیار بزرگ، $d=3/3$ ، $p<0/001$)، در گروه Exe+Supp در قیاس با گروه Supp نیز به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود.

با توجه به درصد تغییرات مشاهده‌شده در متغیرهای مورد مطالعه نسبت به گروه NAFLD و درصد بازگشت به سطوح پایه سالم در جدول پنج و مهم‌تر از همه، اندازه اثر گزارش شده با شاخص d بر مبنای گروه Exe+Supp، به نظر می‌رسد که سهم جداگانه هر یک از مداخلات تمرین هوازی تناوبی و مکمل عصاره کرم آرد در اثر ترکیبی یا تجمعی دو مداخله بر کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های TLR4 ($d=4/6$ برای گروه Exe و $d=4/5$ برای گروه Supp)، NF- κ B ($d=4/6$ برای گروه Exe و $d=4/2$ برای گروه Supp)، تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها ($d=4/1$ برای گروه Exe و $d=4/5$ برای گروه Supp)، اتساع سینوزوئیدها ($d=2/8$ برای گروه Exe و $d=3/2$ برای گروه Supp) و درصد سلول‌های آپوپتوزی ($d=3/4$ برای گروه Exe و $d=3/3$ برای گروه Supp) تقریباً مشابه می‌باشد ($d<0/5$ اختلاف).

بحث

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، ابتلا به NAFLD در موش‌ها باعث افزایش بیان کبدی ژن‌های التهابی شامل TLR4 و NF- κ B و تشدید آسیب‌های هیستوپاتولوژی کبدی شامل افزایش تجمع چربی، اتساع سینوزوئیدها و درصد سلول‌های آپوپتوزی شد. این نتایج، در مطالعات گذشته نیز مورد تایید قرار گرفته است (۳-۵). التهاب کبدی نقش محوری در تبدیل استئاتوز به NASH و تشدید آسیب هپاتوسلولی ایفا می‌کند؛ مطالعات متعدد نشان داده‌اند که بیان افزایش‌یافته TLR4 و NF- κ B در بیماران مبتلا به NAFLD و مدل‌های حیوانی این بیماری، با شدت استئاتوز کبدی و پیشرفت به NASH همبستگی مستقیم دارد (۳-۵).

نتایج اصلی پژوهش حاضر نشان می‌دهد که یک دوره تمرین هوازی تناوبی به‌طور جداگانه و همچنین مکمل‌یاری تنها با عصاره کرم آرد، منجر به کاهش بیان کبدی ژن‌های TLR4 و NF- κ B، کاهش تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها، اتساع سینوزوئیدها و درصد سلول‌های آپوپتوزی کبد موش‌های مبتلا به NAFLD شد؛ با توجه به درصد تغییرات مشاهده‌شده در گروه‌های جداگانه تمرین و مکمل نسبت به گروه مدل NAFLD در کاهش معنی‌دار همه متغیرهای تحقیق، به‌ویژه ژن‌های التهابی (کاهش ۷۲/۷ درصدی TLR4 و ۶۸/۸ درصدی NF- κ B برای تمرین تنها و کاهش ۷۳/۵ درصدی TLR4 و ۷۰/۹ درصدی NF- κ B برای مکمل تنها) و همچنین اندازه‌های اثر بزرگ که بیانگر اثرات فیزیولوژیک برجسته در سطحی فراتر از یافته‌های آماری می‌باشد، به نظر

می‌رسد که می‌توان این نوع تمرین هوازی تناوبی و مکمل‌یاری با عصاره کرم آرد را به عنوان دو مداخله‌ی مستقل موثر در بهبود وضعیت التهابی و آسیب‌های هیستوپاتولوژی کبدی موش‌های مبتلا به NAFLD مطرح نمود.

هم‌راستا با این یافته‌ها، کاوانیشی^۱ و دیگران (۲۰۱۳) نشان دادند که تمرین هوازی تناوبی با شدت بالا^۲ (HIIT) به مدت ۱۲ هفته، بیان پروتئینی TLR4 و NF- κ B را در موش‌های چاق تغذیه‌شده با رژیم پرچرب به‌طور معنی‌داری کاهش داد (۲۱). همچنین، لیندن^۳ و دیگران (۲۰۱۵) گزارش کردند که تمرین هوازی منظم با شدت متوسط، سطوح mRNA ژن‌های التهابی از جمله TLR4 و TNF- α را در کبد موش‌های چاق کاهش می‌دهد و این کاهش با بهبود استئاتوز کبدی همراه بود (۲۲). کیتینگ^۴ و دیگران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند که HIIT می‌تواند از طریق کاهش التهاب سیستمیک و کبدی، استئاتوز و فیروز کبدی را در بیماران مبتلا به NAFLD بهبود بخشد (۲۳). از منظر آسیب‌شناسی بافتی نیز تمرین هوازی اثرات محافظتی قابل توجهی از خود نشان داده است. محققان در پژوهشی مروری در سال ۲۰۲۳ در نمونه‌های مبتلا به NAFLD گزارش کردند که تمرین هوازی موجب کاهش استئاتوز، التهاب، فیروز و تخریب پیش‌رونده‌ی بافت کبد می‌شود (۲۴). هم‌چنین در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۹ گزارش شد که ورزش با کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی، شدت آسیب‌های بافتی کبد را کاهش می‌دهد (۲۵). مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که فعالیت بدنی، به‌ویژه تمرینات هوازی تناوبی، می‌تواند از طریق تعدیل مسیرهای التهابی وابسته به NF- κ B/TLR4، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود وضعیت متابولیکی، نقش مهمی در کاهش آسیب‌های ساختاری کبد در NAFLD ایفا کند. از طرفی یافته‌های پژوهشی محدودی مبنی بر اثربخشی مکمل‌یاری عصاره کرم آرد بر کاهش التهاب و آسیب کبدی در NAFLD موجود می‌باشد. همسو با یافته‌های ما در این زمینه، پارک^۵ و دیگران (۲۰۲۱) در موش‌های مبتلا به چاقی القاشده با رژیم پرچرب، نشان دادند که افزودن پودر لارو *Tenebrio molitor* به رژیم غذایی به‌مدت ۶ هفته باعث کاهش وزن‌گیری، اندازه آدیپوسیت‌ها، لپتین سرمی و کاهش شدت استئاتوز کبدی شد؛ همچنین بیان ژن‌های مرتبط با تمایز آدیپوسیت‌ها در بافت چربی کاهش یافت (۲۶). کانگ^۶ و دیگران (۲۰۲۳) در موش‌های مبتلا به چاقی و سندرم متابولیک گزارش کردند که پروتئین‌های حاصل از فرم‌های مختلف لارو کرم آرد، موجب کند شدن وزن‌گیری، بهبود نیم‌رخ چربی خون، افزایش بیان ژن‌های کبدی مرتبط با تعادل انرژی، پاسخ ایمنی و آنتی‌اکسیدان‌ها و کاهش بیان ژن‌های وابسته به التهاب و آپوپتوز در بافت چربی شدند (۲۷). اخیراً، ون^۷ و دیگران (۲۰۲۵) نیز در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های ماکروفاژ RAW 264.7 نشان دادند که عصاره لارو کرم آرد قادر است بیان برخی کموکاین‌های التهابی را از طریق مهار مسیر NF- κ B کاهش دهد و نفوذ ماکروفاژهای التهابی به بافت را محدود کند (۱۴).

کاهش قابل توجه در بیان ژن‌های التهابی در پژوهش حاضر به دنبال تمرین هوازی، با بهبود همزمان شاخص‌های هیستوپاتولوژیک با اندازه‌های اثر بزرگ که نشانگر اثرات فیزیولوژیک برجسته است، همراه بود. مکانیسم‌های سلولی-مولکولی زیربنایی این اثرات شامل چندین مسیر احتمالی می‌شود: ۱- تمرین هوازی تناوبی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداسیون چربی میتوکندریایی مانند کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز-۱^۸ (CPT-1) و آنزیم‌های چرخه بتا-اکسایش اسید چرب، اکسیداسیون اسیدهای چرب را تسریع کرده و با کاهش لیپوتوکسیسیتی کبدی، تولید لیگاندهای داخلی TLR4 مانند اسیدهای چرب اشباع‌شده پالمیتات و الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب^۹ (DAMPs) را محدود می‌کند و در نتیجه فعال‌سازی مسیر TLR4/پروتئین پاسخ

¹ Kawanishi

² High-intensity interval training

³ Linden

⁴ Keating

⁵ Park

⁶ Kang

⁷ Won

⁸ Carnitine palmitoil transferase-1

⁹ Damage-Associated Molecular Patterns



اولیه تمایز میلوئیدی-۸۸^۱ NF- κ B/(MyD88) مهار می‌شود (۲۸). ۲- بر اساس مطالعات پیشین، تمرین هوازی تناوبی با افزایش بیان و فعالیت پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفوسفات^۲ (AMPK)، فسفریلاسیون مهار کیناز بتای IKK β (IKK β) را القا کرده و از تجزیه IKK و انتقال هسته‌ای NF- κ B جلوگیری می‌کند؛ این مهار NF- κ B منجر به کاهش رونویسی ژن‌های هدف التهابی مانند IL-6 و TNF- α می‌شود (۲۹). اگرچه در مطالعه‌ی حاضر سطوح این شاخص‌ها اندازه‌گیری نشده و از محدودیت‌های پژوهش ما به‌شمار می‌رود. ۳- تمرین هوازی با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد، استرس اکسیداتیو را کاهش داده و تولید ROS را محدود می‌کند؛ کاهش ROS به‌طور مستقیم از فعال‌سازی NF- κ B که به‌وسیله ROS تحریک می‌شود، جلوگیری می‌کند (۳۰). از سویی دیگر، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که مکمل‌یاری مستقل با عصاره کرم آرد توانست بیان کبدی TLR4 و NF- κ B را به‌ترتیب ۷۳/۵٪ و ۷۰/۹٪ کاهش دهد که این میزان با اندازه اثر بزرگ همراه بود و نشان‌دهنده اثرات فیزیولوژیک برجسته‌ای فراتر از معنی‌داری آماری صرف است. قابل توجه است که این درصد کاهش در گروه مکمل تنها با گروه تمرین تنها تقریباً مشابه و حتی اندکی برتر بود که این یافته اهمیت بالینی ویژه‌ای دارد؛ چراکه مکمل‌یاری با کرم آرد می‌تواند به‌عنوان مداخله‌ای مستقل و مؤثر برای بیمارانی که توانایی انجام تمرین ورزشی ندارند، مطرح شود. ممکن است که مکانیسم‌های سلولی احتمالی این اثرات چندوجهی باشد؛ کرم آرد سرشار از پپتیدهای زیست‌فعال و ترکیبات فنولیک مانند کوئرستین و کاتچین است که با اتصال رقابتی به دامنه خارج‌سلولی TLR4 یا مهار دایمریزاسیون فاکتور تمایز میلوئیدی-۲^۴ (MD-2)/TLR4، از شناسایی لیگاند‌های پیش‌التهابی مانند لیپوپلی‌ساکاریدها^۵ (LPS) و اسیدهای چرب اشباع جلوگیری می‌کنند و در نتیجه آبشار سیگنالینگ MyD88/TRIF/NF- κ B را در ابتدای مسیر مسدود می‌سازند (۳۱). از طرفی کیتین موجود در لایه خارجی کرم آرد، با تعدیل میکروبیوم روده و کاهش نفوذپذیری روده‌ای، از انتقال LPS باکتریایی به گردش خون عمومی جلوگیری کرده و بدین‌ترتیب یکی از محرک‌های اصلی فعال‌سازی TLR4 کبدی را در مبدأ مهار می‌کند (۳۲). پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی کرم آرد نیز با کاهش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو، تولید ROS را کاهش داده و از فعال‌سازی ردوکس وابسته NF- κ B جلوگیری می‌کنند؛ این کاهش استرس اکسیداتیو هم‌چنین از طریق تعدیل مسیر میتوکندریایی مرتبط با سیتوکروم C از آپوپتوز هپاتوسیت‌ها پیشگیری می‌کند (۳۳).

با وجود همسویی گسترده یافته‌های ما با اکثر مطالعات، برخی تحقیقات نتایج متفاوتی گزارش کرده‌اند؛ رکتور^۶ و دیگران (۲۰۰۸) گزارش کردند که تمرین هوازی به مدت ۶ هفته تأثیر محدودی بر کاهش بیان TLR4 در بافت چربی و کبد موش‌های چاق داشت (۳۴). این تفاوت می‌تواند ناشی از مدت کوتاه‌تر مداخله و شدت پایین‌تر تمرین باشد؛ مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات معنی‌دار در بیان ژن‌های التهابی کبدی معمولاً به مداخلات طولانی‌تر از هشت هفته و شدت‌های بالاتر نیاز دارد تا تطابقات مولکولی پایدار ایجاد شود (۳۵).

اصلی‌ترین یافته‌های نوین پژوهش حاضر نشان می‌دهد که یک دوره تمرین هوازی تناوبی در کنار دریافت مکمل عصاره کرم آرد توانست بیان کبدی ژن‌های TLR4 و NF- κ B، تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها، اتساع سینوزوئیدها و درصد سلول‌های آپوپتوزی کبد را در موش‌های مبتلا به NAFLD با اندازه‌های اثر بزرگ کاهش دهد؛ ترکیب تمرین هوازی با کرم آرد، بالاترین درصد تغییرات را در کاهش TLR4 (۹۶/۳٪) و NF- κ B (۹۲/۸٪)، تعداد قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها (۶۶/۶٪)، اتساع سینوزوئیدها (۶۶/۵٪) و درصد سلول‌های آپوپتوزی (۵۵/۸٪) در قیاس با مداخله تمرین تنها و مکمل تنها در موش‌های مبتلا به NAFLD داشت. از طرفی بیش‌ترین درصد بازگشت تمامی متغیرهای مورد مطالعه به سطوح پایه سالم در بین مداخلات

¹ Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88

² Adenosine monophosphate-activated protein kinase

³ IKK Kinase Beta

⁴ Myeloid Differentiation factor 2

⁵ Lipopolysaccharide

⁶ Rector



پژوهشی در گروه ترکیب تمرین با مکمل مشاهده شد؛ در این راستا، بیان ژن‌های التهابی TLR4 و NF-KB پس از دریافت مداخله ترکیبی، به‌طور معنی‌داری به سطوح پایه سالم بازگشت. هم‌چنین پس از دریافت مداخله ترکیبی تمرین و مکمل در مقایسه با هر یک از مداخلات به تنهایی، بیان ژن‌های التهابی و آسیب‌های هیستوپاتولوژی کبد، کاهش معنی‌دار بیشتری نشان داد. اگرچه با توجه به اندازه‌های اثر مشاهده شده، سهم جداگانه هر یک از مداخلات تمرین هوازی تناوبی و مکمل عصاره کرم آرد در اثر ترکیبی یا تجمعی دو مداخله بر کاهش تمامی متغیرهای تحقیق تقریباً مشابه بود.

این یافته‌های پژوهشی با شواهد علمی محدود اما رو به رشد همسو است. در این راستا، مونسان و همکاران (۲۰۲۴) در پژوهشی تجربی روی موش‌های مبتلا به NAFLD نشان دادند که تمرین هوازی در کنار مصرف پروتئین کرم آرد، وضعیت تام اکسیداتیو و آنزیم‌های کبدی را کاهش و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد (۳۶). باقرپور و همکاران (۱۴۰۴) نیز گزارش کردند که تجویز همزمان تمرین استقامتی و عصاره کرم آرد در موش‌های مبتلا به NAFLD، در بهبود وضعیت اکسیداتیو و تعدیل متابولیسم چربی کبدی مؤثر است (۳۷).

ترکیب تمرین هوازی تناوبی با مکمل‌یاری عصاره کرم آرد در مطالعه‌ی حاضر، بیان کبدی TLR4 و NF-KB را به‌ترتیب ۹۶/۳٪ و ۹۲/۸٪ کاهش داد که این میزان به‌طور معنی‌داری برتر از مداخلات مستقل تمرین تنها (۷۲/۷٪ و ۶۸/۸٪) و مکمل تنها (۷۳/۵٪ و ۷۰/۹٪) بود؛ این یافته نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی قابل‌توجه دو مداخله است که فراتر از جمع ساده اثرات جداگانه آن‌ها عمل می‌کند. قابل‌توجه است که مداخله ترکیبی توانست بیان ژن‌های التهابی را به سطوح بسیار نزدیک به پایه سالم بازگرداند، در حالی که مداخلات مستقل تنها بهبود جزئی ایجاد کردند؛ هم‌چنین، کاهش آسیب‌های هیستوپاتولوژیک کبدی در گروه ترکیبی، برتری بالینی این رویکرد را در بازگرداندن معماری بافتی کبد تأیید می‌کند. تبیین مکانیسم‌های زیربنایی احتمالی این اثر هم‌افزایی نشان می‌دهد که تمرین هوازی تناوبی شاید بتواند با افزایش اکسیداسیون چربی از طریق فعال‌سازی AMPK و افزایش بیان CPT-1، تجمع اسیدهای چرب آزاد داخل هپاتوسیت‌ها را کاهش دهد؛ این کاهش لیگاند‌های اندوژن TLR4 همزمان با مهار مستقیم TLR4 توسط پپتیدهای زیست‌فعال کرم آرد، احتمالاً منجر به مسدودسازی دوگانه و قوی‌تر مسیر TLR4/MyD88/NF-KB می‌شود (۳۱، ۲۹). در همین راستا بر اساس پیشینه تحقیقات، افزایش فعالیت AMPK به دنبال تمرین هوازی با فعال کردن بتا-اکسایش در هپاتوسیت‌ها، سطوح دی‌آسیل گلیسرول^۱ (DAG) و سرامیدهای داخل سلولی را کاهش داده و با تاثیر مثبت بر گیرنده‌ی سوپرسترای انسولین^۲ (IRS) در کبد، حساسیت انسولینی را بهبود می‌بخشد؛ این بهبود همزمان با اثر PUFA موجود در کرم آرد بر فعال‌سازی PPAR- α/γ ، منجر به کاهش لیپوژنز و افزایش لیپولیز می‌شود که در نهایت ممکن است استئاتوز کبدی را به‌طور مؤثرتری کاهش دهد (۲۹، ۲۸، ۱۴). علاوه بر این، ترکیبات فنولیک کرم آرد با مهار فسفریلاسیون IKK β و تمرین هوازی با افزایش بیان IKK- α ، شاید به‌طور هم‌افزایی از تجزیه پروتئازومی IKK و انتقال هسته‌ای p65 NF-KB جلوگیری کنند؛ این مهار دوگانه منجر به کاهش شدید رونویسی ژن‌های هدف التهابی به‌ویژه TNF- α ، IL-1 β و سایکلو‌اکسیژناز^۳ (COX-2) ژن‌های پیش‌آپوپتوزی مانند کاسپاز-۳ می‌شود که توجیه‌کننده کاهش برجسته آپوپتوز هپاتوسیت‌ها در گروه مداخله ترکیبی است (۳۱، ۲۹). در مجموع، اثر هم‌افزایی مشاهده‌شده ناشی از تقویت متقابل مکانیسم‌های ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و متابولیک دو مداخله است که احتمالاً به‌طور همزمان بر چندین نقطه کلیدی مسیر TLR4/NF-KB و متابولیسم چربی کبدی اثر می‌گذارند و در نتیجه بازگشت شاخص‌های التهابی و هیستوپاتولوژیک به سطوح بسیار نزدیک به پایه سالم را ممکن می‌سازند.

از جمله محدودیت‌های احتمالی این پژوهش می‌توان به عدم کنترل دقیق تأثیر احتمالی استرس ناشی از شوک دستگاه نوارگردان، عدم ارزیابی سطح خونی ترکیبات فعال عصاره کرم آرد برای تأیید جذب واقعی و رسیدن به بافت کبد و عدم دسترسی به تعداد نمونه آماری بالاتر اشاره کرد. اگرچه حجم نمونه در هر گروه نسبتاً کوچک بود، با این حال برای پیامدهای اصلی و

¹ Di acyl glycerol

² Insulin substrate receptor

³ Cyclooxygenase-2



کاربردی، اندازه‌های اثر بزرگی به دست آمد که مؤید اهمیت عملی نتایج است. هم‌چنین عدم اندازه‌گیری بیان ژن و یا پروتئین‌های پایین دست مسیر TLR4/NF-KB، به‌ویژه $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $IL-6$ که ممکن است در تعیین مکانیسم اثر مداخلات پژوهشی ما موثر باشند نیز از دیگر محدودیت‌های پژوهش به‌شمار می‌رود. با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، پیشنهاد می‌شود که مطالعات آینده با طراحی کارآزمایی بالینی تصادفی‌شده، اثربخشی این مداخله ترکیبی را در بیماران مبتلا به NAFLD با سطوح مختلف شدت بیماری و با ارزیابی بیومارکرهای التهابی مختلف سرمی و بیوپسی کبدی مورد بررسی قرار دهند.

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی تناوبی به‌عنوان یک مداخله مستقل، احتمالاً از طریق فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی کلیدی نظیر AMPK، افزایش اکسیداسیون چربی و کاهش استرس اکسیداتیو، می‌تواند کاهش معنی‌داری در سطوح TLR4 و NF-KB و بهبود شاخص‌های هیستوپاتولوژیک کبد در موش‌های مبتلا به NAFLD ایجاد نماید. مکمل‌یاری کرم آرد نیز به‌صورت مستقل، ممکن است از طریق مهار مسیر TLR4/MD-2/MyD88/NF-KB، خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال، تعدیل متابولیسم چربی و بهبود میکروبیوم روده کاهش قابل‌توجهی در التهاب و آسیب کبدی در موش‌های مبتلا به NAFLD ایجاد کرده باشد. شایان ذکر است که اثربخشی دو مداخله مستقل در کاهش بیان ژن‌های التهابی و بهبود ساختار بافت کبد تقریباً مشابه بود که نشان‌دهنده پتانسیل مستقل هر یک در مدیریت NAFLD است. با این حال، مداخله ترکیبی با ایجاد هم‌افزایی برتری قابل‌توجهی نسبت به هر یک از مداخلات مستقل نشان داد و شاخص‌های التهابی را به سطوح نزدیک به گروه سالم بازگرداند. در واقع، ترکیب دو مداخله ممکن است از طریق مکانیسم‌های احتمالی متفاوت اما مکمل از جمله تعدیل متابولیسم و افزایش اکسیداسیون چربی و کاهش استرس اکسیداتیو، اثرات برتری نسبت به هر یک از مداخلات مستقل در بهبود NAFLD داشته باشد. بنابراین، ترکیب تمرین هوازی تناوبی با مکمل‌یاری کرم آرد می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی غیردارویی، ایمن و مقرون‌به‌صرفه برای پیشگیری و درمان NAFLD و کاهش پیشرفت آن به مراحل پیشرفته‌تر مورد توجه قرار گیرد؛ اگرچه با توجه به ماهیت مدل حیوانی در این پژوهش، تعمیم نتایج به جوامع انسانی امکان‌پذیر نبوده و پیشنهاد می‌گردد که اثربخشی این مداخلات ترکیبی در تحقیقات نیمه‌تجربی آینده نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تداخلی در منافع وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

این مقاله بر اساس پایان نامه دکتری تخصصی که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج 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. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
2. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>



3. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
4. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. 2011;54(1):133-44. <https://doi.org/10.1002/hep.24341>
5. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009;50(4):1094-104. <https://doi.org/10.1002/hep.23122>
6. Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46(3):823-30. <https://doi.org/10.1002/hep.21752>
7. Ye D, Li FY, Lam KS, Li H, Jia W, Wang Y, et al. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut*. 2012;61(7):1058-67. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300269>
8. Singh S, Osna NA, Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol*. 2017;23(36):6549-70. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6549>
9. Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012;57(1):157-66. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.023>
10. Abdelbasset WK, Tantawy SA, Kamel DM, Alqahtani BA, Elnegamy TE, Soliman GS, Ibrahim AA. Effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous aerobic exercise on diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease: a comparative randomized controlled trial. *Medicine*. 2020 Mar 1;99(10):e19471. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000019471>
11. Zhu W, Sahar NE, Javaid HM, Pak ES, Liang G, Wang Y, Ha H, Huh JY. Exercise-induced irisin decreases inflammation and improves NAFLD by competitive binding with MD2. *Cells*. 2021 Nov 25;10(12):3306. <https://doi.org/10.7150/ijbs.63788>
12. Fredrickson G, Barrow F, Dietsche K, Parthiban P, Khan S, Robert S, Demirchian M, Rhoades H, Wang H, Adeyi O, Revelo XS. Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH. *Molecular Metabolism*. 2021;53:101270. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.05.004>
13. Noori Mofrad SR, Golpasandi H, Sakhaei MH, Khalafi M. The effect of high intensity interval training on inflammatory markers in patient with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2022 Sep 23;9(2):123-37. <https://doi.org/10.22040/jcme.2020.18507>
14. Won S, Zheng J, No C, Ha Y, Lee S, Ha JH, Jeong Y. Antioxidant Activities of *Tenebrio molitor* Hydrolysates and Their Effects on the Expressions of Pro-inflammatory Cytokines in the Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7



- Macrophages. Food Supplements and Biomaterials for Health. 2025 Sep 23;5(3). <https://doi.org/10.52361/fsbh.2025.5.e17>
15. Kim TK, Yong HI, Kim YB, Kim HW, Choi YS. Edible insects as a protein source: a review of public perception, processing technology, and research trends. Food science of animal resources. 2019 Aug 31;39(4):521. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e53>
 16. Seo M, Goo TW, Chung MY, Baek M, Hwang JS, Kim MA, Yun EY. Tenebrio molitor larvae inhibit adipogenesis through AMPK and MAPKs signaling in 3T3-L1 adipocytes and obesity in high-fat diet-induced obese mice. International journal of molecular sciences. 2017 Feb 28;18(3):518. <https://doi.org/10.3390/ijms18030518>
 17. 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. J Hepatol. 2012;57(4):860-6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.05.019>
 18. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int J Exp Pathol. 2006;87(1):1-16. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>
 19. 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>
 20. Kim SY, Park JE, Han JS. Tenebrio molitor (mealworm) extract improves insulin sensitivity and alleviates hyperglycemia in C57BL/Ksj-db/db mice. Journal of Life Science. 2019;29(5):570-9. <https://doi.org/10.1007/s13596-024-00813-7>
 21. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. Exerc Immunol Rev. 2013;19:54-74. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000425713.58847.76>
 22. Linden MA, Sheldon RD, Meers GM, Ortinau LC, Morris EM, Booth FW, et al. Aerobic exercise training in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease related fibrosis. J Physiol. 2015;593(8):1159-72. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.285332>
 23. Keating SE, Hackett DA, Parker HM, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. J Hepatol. 2020;63(1):174-82. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.022>
 24. Heinle JW, DiJoseph K, Sabag A, Oh S, Kimball SR, Keating S, Stine JG. Exercise Is Medicine for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Exploration of Putative Mechanisms. Nutrients. 2023 May 24;15(11):2452. <https://doi.org/10.3390/nu15112452>
 25. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. Eur J Sport Sci. 2019 Aug;19(7):994-1003. <https://doi.org/10.1080/17461391.2019.1571114>



26. Park BM, Lim HJ, Lee BJ. Anti-obesity effects of *Tenebrio molitor* larvae powder in high-fat diet-induced obese mice. *J Nutr Health*. 2021 Aug;54(4):342-354. <https://doi.org/10.4163/jnh.2021.54.4.342>
27. Kang Y, Applegate CC, He F, Oba PM, Vieson MD, Sánchez-Sánchez L, Swanson KS. Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) and Lesser Mealworm (*Alphitobius diaperinus*) Proteins Slowed Weight Gain and Improved Metabolism of Diet-Induced Obesity Mice. *J Nutr*. 2023 Aug;153(8):2237-2248. <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2023.06.014>
28. Jia L, Chang X, Qian S, Liu C, Lord CC, Ahmed N, et al. Hepatocyte Toll-like receptor 4 deficiency protects against alcohol-induced fatty liver disease. *Mol Metab*. 2018;14:121-9. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.015>
29. Steinberg GR, Schertzer JD. AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: implications for diabetes and cardiovascular disease. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(4):340-5. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.11>
30. Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*. 2008;60(5):308-14. <https://doi.org/10.1002/iub.46>
31. Park JH, Kim JY, Yun EY, Hwang JS, Goo TW, Seo M. Bioactive peptides from *Tenebrio molitor* competitively inhibit TLR4/MD-2 dimerization and downstream MyD88/NF- κ B signaling. *J Agric Food Chem*. 2020;68(22):6178-87. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01234>
32. Oonincx DG, van Isterbeeck J, Heetkamp MJ, van den Brand H, van Loon JJ, van Huis A. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS One*. 2010;5(12):e14445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>
33. Lim SJ, Yoo JW, Kim HS, Kwon MG, Kang JH, Kim KW. Antioxidant peptides from *Tenebrio molitor* larvae inhibit NADPH oxidase-mediated ROS production and mitochondrial apoptosis in hepatocytes. *Food Funct*. 2021;12(8):3461-72. <https://doi.org/10.1039/D0FO003234A>
34. Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, et al. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(3):G619-26. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00428.2007>
35. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut*. 2011;60(9):1278-83. <https://doi.org/10.1136/gut.2011.242073>
36. Mounesan A., Rahimi A., Aghaei F., Sarshin A. The effect of aerobic exercise combined with mealworm protein consumption on oxidant, antioxidant indices and FGF21 and mTOR gene expression in soleus muscle of rats with fatty liver. *JEOCT*, 2024; 4(4): 284-291. <https://doi.org/10.22122/jeoct.2025.510227.1144>
37. Bagherpour, Z., Rahimi, A., Aghaei, F., Feizolahi, F. The Effect of Simultaneous Intervention of Interval Aerobic Training and Mealworm Extract on the Expression of CHOP and BIP Genes and Oxidative Stress Markers MDA and SOD in Liver Tissue of

نسخه پیش از انتشار ویدئویش نشده