

تأثیر یک دوره تمرین‌های هوازی با تعداد روزهای متفاوت به همراه گرسنگی بر عملکرد پروتئین چاپرون رتیکولوم اندوپلاسمیک در کبد رت‌های مدل سالم نژاد ویستار

منیره خلیلی^۱، حبیب اصغرپور*^۲، اسرا عسکری^۲، جهانبخش اسدی^۳

چکیده

مقدمه: سلامت و عملکرد مناسب رتیکولوم اندوپلاسمیک در کبد می‌تواند منجر به افزایش کیفیت متابولیسم سلول‌های کبد شود. فعالیت ورزشی می‌تواند با تنظیم آنزیم‌های کبدی و عوامل مرتبط با مسیر آپوپتوز منجر به سلامت کبد شوند. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، مقایسه عملکرد پروتئین چاپرون (CHOP) رتیکولوم اندوپلاسمیک کبد رت‌های مدل سالم با مداخله جلسات تمرینی متفاوت و گرسنگی است.

روش‌ها: در تحقیق تجربی حاضر تعداد ۳۰ سر رت نژاد ویستار با دامنه وزنی 25 ± 330 گرم انتخاب و به شش گروه (۱ کنترل، ۲ گرسنگی، ۳ ۳ روز تمرین در هفته، ۴ ۵ روز تمرین در هفته، ۵ گرسنگی + ۳ روز تمرین در هفته، ۶ گرسنگی + ۵ روز تمرین در هفته تقسیم شدند. تمرین ورزشی شامل یک ساعت دویدن مداوم به مدت ۴ هفته روی تردمیل بود و گرسنگی به مدت ۴ ساعت در زمان بیداری رت‌ها انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و تعقیبی LSD در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها تغییر معنی‌داری در سطوح آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات ترانس آمیناز (AST) نشان داد ($P \leq 0/05$). این تغییر در بیان ژن CHOP نیز معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: تمرین‌های هوازی ۳ و ۵ روزه همراه با گرسنگی با کاهش آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) و عامل مرتبط با مرگ سلولی (CHOP) از طریق مسیر آپوپتوز می‌تواند منجر به سلامت کبد می‌شود.

واژگان کلیدی: گرسنگی، تمرین هوازی، آنزیم‌های کبدی، بیان ژن چاپرون، رتیکولوم اندوپلاسمیک

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

۳- مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

* **نشانی:** گلستان، شهرستان علی‌آباد کتول، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی‌آباد کتول، تلفن: ۰۹۱۱۳۹۲۲۱۲۴، پست الکترونیکی:

Habibasgharpour@gmail.com

مقدمه

شبکه اندوپلاسمیک (ER) یک اندامک سلولی موجود در تمام سلول‌های یوکاریوتی است که بسیاری از عملکردهای ضروری سلولی از جمله سنتز و پردازش پروتئین، سنتز لیپید و ذخیره کلسیم را انجام می‌دهد. استرس ER زمانی رخ می‌دهد که انباشته شدن بیش از حد پروتئین باز شده و نادرست در آن اتفاق بیفتد یا زمانی که کلسیم ER تخلیه می‌شود [۱، ۲].

کبد بزرگترین اندام متابولیک است و سرشار از سیستم‌های آنزیمی است که وظایفی مانند متابولیسم و ترشح را انجام می‌دهد. علاوه بر این، محل اصلی سنتز پروتئین در بدن است؛ بنابراین، یک سیستم ER به خوبی توسعه یافته در سلول‌های کبدی وجود دارد تا به کبد در انجام عملکردهای فیزیولوژیکی خود کمک کند [۳]. هنگامی که عوامل نامطلوب کبد را تحریک می‌کنند، باعث اختلال در سنتز و متابولیسم کبد می‌شود و این فعال‌شدن می‌تواند منجر به تحریک و فعال‌شدن یک سری واکنش‌های آبخاری شود که درجات مختلف آسیب به کبد را رقم می‌زند و در نهایت سلامت انسان را به‌طور جدی تهدید می‌کند [۴].

هیپاتوسیت‌ها نوع سلولی غالب در کبد هستند و مسئول تولید مقادیر زیادی پروتئین‌های ترشحی هستند. با توجه به نیاز زیاد به سنتز پروتئین و تاخوردگی، سلول‌های کبدی در ER مستعد اختلال و استرس هستند. پس از استرس ER، یک پاسخ سلولی تطبیقی به نام پاسخ پروتئین باز شده (UPR) برای بازگرداندن هموستاز ER و ارتقاء بقای سلول فعال می‌شود [۵]. با این حال، هنگامی که ترمیم با شکست مواجه می‌شود، استرس طولانی‌مدت ER و فعال‌شدن UPR باعث مرگ سلولی می‌شود. استرس ER و UPR در پاتوژنز بیماری‌های انسانی، از جمله بیماری‌های کبدی دخیل هستند و رویکردهای درمانی فعلی برای هدف قرار دادن استرس ER است [۶].

UPR یک پاسخ تطبیقی به استرس ER است. این پروتئین از سه پروتئین سنسور استرس ER گذرا شامل اینوزیتول ۱ (IRE1)، کیناز رتیکیلوم اندوپلاسمیک شبیه PRKR (PERK) و فعال‌کننده فاکتور رونویسی ۶ (ATF6) تشکیل شده است [۷]. این سه شاخه UPR، پاسخی را برای بازگرداندن هموستاز ER ناشی از تنش‌های مختلف سلولی تنظیم می‌کنند. با این

حال استرس ER کاهش نیافته و فعال‌سازی طولانی‌مدت UPR ممکن است منجر به آپوپتوز سلولی شود [۴].

سازکارهای متعددی برای آپوپتوز ناشی از استرس ER پیشنهاد شده است. چاپرون (CHOP) یک واسطه اصلی برای آپوپتوز ناشی از استرس ER را کاهش می‌دهد درحالی که بیان بیش از حد CHOP، سلول‌ها را نسبت به آپوپتوز حساس می‌کند [۸]. CHOP به‌صورت رونویسی تعدادی از ژن‌های پروآپوپتوز از جمله گیرنده مرگ ۵ (DR5)، لنفوم سلول B2 (Bcl-2) شبه پروتئین ۱۱ (BIM)، زیرواحد تنظیم‌کننده A-۱۵ پروتئین فسفاتاز ۱ (GADD34) و تریپل‌های همولوگ ۳ (TRB3) را فعال و بیان BCL2 ضد آپوپتوز را سرکوب می‌کند، بنابراین در طول استرس ER باعث آپوپتوز می‌شود [۵]. چندین راهبرد دارویی و غیردارویی برای تسکین تغییرات مضر مرتبط با بافت کبدی پیشنهاد شده است. در میان رویکردهای غیردارویی، سازگاری‌های چند سیستمی با واسطه فعالیت‌های ورزشی، ترویج ارتباط متقابل بین اندام‌ها و هماهنگ کردن اثرات پرومتابولیک برای کاهش اختلالات مرتبط با متابولیسم مانند استرس شبکه اندوپلاسمیک شناخته شده است [۹].

سازکارهای بیولوژیکی زیربنای تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر کبد هنوز به خوبی شناخته نشده است. مطالعه‌های قبلی [۱۱، ۱۰] نشان می‌دهد که فعالیت‌های ورزشی هوازی نشانگر گردش خون آپوپتوز سلول‌های کبدی را در افراد کم تحرک کاهش می‌دهد؛ با این حال کاهش آپوپتوز ممکن است با ظرفیت اکسیداسیون چربی مرتبط باشد [۱۲]. علاوه بر این، Goncalves و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تمرین ورزشی هوازی از آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری جلوگیری می‌کند، آسیب‌های سلولی غشاء را کاهش می‌دهد و بنابراین میتوکندری سیگنال‌های آپوپتوز را در سلول‌های کبدی هدایت می‌کند. با این حال، نقش و سازکار اساسی تمرین ورزشی در آپوپتوز هیپاتوسیت هنوز به خوبی شناخته نشده است [۱۳]. در تحقیق Ruan و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی تأثیر شدت‌های مختلف تمرین ورزشی بر آپوپتوز هیپاتوسیت در رت‌هایی که مشکلات کبدی داشتند، پرداختند. در این تحقیق نقش احتمالی استرس شبکه اندوپلاسمی از طریق تنظیم مسیرهای سیگنال IRE1/JNK و eIF2 α /CHOP بررسی شد. تمرین ورزشی در

رفتار این آنزیم‌ها به دنبال انواع شرایط تمرینی از قبیل مدت‌زمان، شدت، نوع آزمودنی و غیره نرسیده‌اند. سازکارهای دیگر سلولی مانند رتیکولوفازی و آپوپتوز سلول‌های کبدی و تنظیم سلامت عملکرد این سلول‌های نیز بسیار مهم است که پروتئین‌های مختلفی مانند CHOP درگیر در این مسیرها هستند. با توجه به حائز اهمیت بودن آنزیم‌های کبدی و عوامل سلولی برای عملکرد کبد، هدف محققان تحقیق حاضر بررسی مقایسه عملکرد پروتئین چاپرون رتیکولوم اندوپلاسمیک کبد رت‌های مدل سالم با مداخله جلسات تمرینی متفاوت و گرسنگی است.

روش‌ها

نمونه و نوع پژوهش

پژوهش حاضر بر روی ۳۰ سر رت نر کبد سالم نژاد ویستار با دامنه سنی ۱۸ تا ۲۰ هفته‌ای با میانگین وزن 330 ± 25 گرم انجام گرفت. موش‌ها به صورت تصادفی ساده در ۶ گروه ۵ تایی (شامل: ۱) کنترل، ۲) گرسنگی، ۳) ۳ روز تمرین هوازی، ۴) ۵ روز تمرین هوازی، ۱) گرسنگی+۳ روز تمرین هوازی، ۵) گرسنگی+۵ روز تمرین هوازی تقسیم شدند. رت‌ها 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 در مرکز علوم حیوانات دانشگاه علوم پزشکی گرگان نگهداری شدند. تمامی رت‌ها به آب و غذای (پلت) استاندارد (۱۰ گرم غذا به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن رت) دسترسی آزاد داشتند. تمام مراحل نگهداری و کشتار موش‌ها براساس دستورالعمل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.GOUMS.REC.1401.005 انجام شد.

برنامه تمرینی

کل دوره تمرین شامل دو مرحله آشنایی و تمرین اصلی است. هدف از مرحله آشنایی، سازگاری با محیط پژوهش و تردمیل بود. بدین منظور به مدت یک هفته، حیوانات تحت شرایط تمرین آزمایشی به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و تمرین ورزشی طی ۴ هفته به تعداد ۳ و ۵ روز در هفته به مدت ۴۵-۶۰ دقیقه روی تردمیل انجام شد. برنامه تمرین اصلی در این مطالعه در

شدت‌های مختلف باعث بهبود چربی خون و آسیب کبدی شد. تمرین ورزشی با شدت متوسط تأثیر بیشتری بر بهبود توانایی آنتی‌اکسیدانی و مهار آپوپتوز سلول‌های کبدی نشان داد. سازکار احتمالی به تنظیم مسیرهای سیگنالینگ استرس شبکه اندوپلاسمیک از طریق مسیرهای IRE1/JNK و eIF2 α /CHOP بستگی دارد [۱۵].

آنزیم‌های کبدی آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپاراتات ترانس آمیناز (AST) آنزیم‌هایی هستند که در سلول‌های کبدی، عضلات قلبی و اسکلتی، کلیه‌ها، مغز، پانکراس، ریه‌ها و گلبول‌های قرمز وجود دارند و برای آسیب‌های کبدی اختصاصی‌تر است. هنگامی که آسیب کبدی وجود دارد، این آنزیم‌ها معمولاً در آزمایشات کبدی یافت می‌شوند و برای تشخیص و نظارت بر بیماری‌های کبدی ضروری هستند. با این حال، شرایط حاد ممکن است مقادیر بالاتری را نشان دهد و مقادیر کمتر/طبیعی ممکن است منعکس‌کننده دیگر بیماری‌های کبدی مزمن باشد [۱۵]. بنابراین، صرف نظر از معاینه تصویربرداری، اندازه‌گیری آنزیم‌ها و عملکردهای کبدی، مانند ALT و AST، برای انجام تشخیص آسیب‌شناسی‌هایی که بر کبد تأثیر می‌گذارند ضروری است و مهم است که نشان داده شود که ترانس‌آمینازها ممکن است بالا یا در محدوده مقادیر نرمال باشند [۱۶، ۱۷].

نشان داده شده است که انجام فعالیت‌های بدنی همراه با تنظیم رژیم غذایی در تنظیم آنزیم‌های کبدی و عوامل مرتبط بسیار تأثیرگذار است و می‌تواند یک درمان غیر دارویی باشد. در این راستا در تحقیقی Ezpeleta و همکاران (۲۰۲۳) اثر گرسنگی (روزه‌داری) متناوب همراه با تمرین ورزشی هوازی بر بافت کبد را بررسی کردند. سطوح ALT به طور قابل توجهی کاهش یافت؛ در حالی که سطوح AST تغییر معنی‌داری را نشان نداد. این محققان بیان کردند که ترکیب گرسنگی متناوب با تمرین ورزشی برای کاهش عوارض کبدی به وجود آمده از طریق بیماری مؤثر است و می‌تواند درمان غیردارویی برای سلامت کبدی باشد [۱۸].

تنظیم سلامت متابولیسم کبدی از طریق اندازه‌گیری آنزیم‌های آن مانند ALT و AST بسیار حائز اهمیت است و با وجود بررسی‌های فراوان تمرین‌های ورزشی بر روی این آنزیم‌ها هنوز محققان و فیزیولوژیست‌های ورزشی به درک کاملی از

جدول ۱ نشان داده شده است. تمرین رت‌ها روی تردمیل با شیب صفر درجه با سرعت ۱۴ متر در دقیقه است. بعد از طی جلسات تمرین سرعت تردمیل به ۱۶ و ۱۸ متر در دقیقه با شیب صفر درجه رسید (جدول ۱) [۱۹].

جدول ۱- پروتکل تمرین هوازی

مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۴	مرحله ۵	مرحله ۶	هفته
سرعت-مدت	سرعت-مدت	سرعت-مدت	سرعت-مدت	سرعت-مدت	سرعت-مدت	
-	-	-	-	-	-	هفته اول سازگاری با محیط
۴-۸	۸-۱۰	۳-۵	-	-	-	هفته دوم آشنایی با تمرین
۵-۷	۵-۱۰	۲۰-۱۴	۱۰-۷	۵-۴	-	هفته اول تمرین
۷-۸	۷-۱۴	۲۵-۱۶	۱۰-۱۲	۶-۶	-	هفته دوم
۵-۸	۱۰-۱۴	۲۰-۱۸	۱۰-۱۴	۱۰-۱۰	۵-۵	هفته سوم
۵-۸	۱۰-۱۴	۲۰-۱۸	۱۰-۱۴	۱۰-۱۰	۵-۵	هفته چهارم

پروتکل القای گرسنگی

۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کتامین و سه تا پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن زایلازین، بی‌هوش شدند. نمونه بافت کبد هر حیوان بلافاصله با سالیین شستشو داده و در تیوب استریل کرایو قرار گرفته و در محلول نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های ارزیابی مقدار تغییرات بیان ژن در فریزر ۸۰- درجه نگهداری شدند.

پروتکل گرسنگی به مدت یک ماه، هر روز به مدت ۱۴ ساعت در زمان چرخه بیداری (۵/۵ عصر تا ۷/۵ صبح) رت‌ها اعمال گردید. جهت القای گرسنگی، رت‌های گروه‌های گرسنگی، همان مقدار معمول غذای نرمال (۱۰ گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن رت) مواد غذایی که مابقی گروه‌ها در طی ۲۴ ساعت دریافت می‌کردند را در طی ۱۰ ساعت مصرف می‌کردند [۲۰].

روش‌های اندازه‌گیری متغیرها و بیان ژن CHOP

سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST با استفاده از کیت‌های بیوشیمیایی و دستگاه اتوآنالایزر طبق جدول ۲ اندازه‌گیری شدند.

روش بافت برداری

پس از ۴ هفته تمرین و ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ ساعت ناشتایی بافت برداری انجام شد. رت‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از ۳۰ تا

جدول ۲- کیت سنجش آنزیم‌های کبدی و لیپیدهای سرمی

نام دستگاه	روش تست	کشور سازنده	برند	نام کیت	نام تست
BS480	کیتیک	IRAN	فرا سامد	Alt	Alt
BS480	کیتیک	IRAN	فرا سامد	AST	AST

میزان بیان ژن CHOP به روش کمی PCR Real-Time با استفاده از روش گرین SYBR توسط یکتا تجهیز مستر میکس (تهران، ایران با سریال نامبر: YT2552) استفاده شد. ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان یک ژن کنترل داخلی استفاده شد و بیان ژن‌های مورد نظر با فرمول

برای ارزیابی سطوح بیان ژن CHOP، ابتدا RNA از بافت‌ها در تمام گروه‌های مورد مطالعه بر اساس پروتکل‌های شرکت آزما یکتا تجهیز (تهران، ایران؛ سریال نامبر: FABRK001) استخراج شد. سپس کیفیت و کمیت RNA با دستگاه نانو قطره دانشگاه علوم پزشکی گلستان اندازه‌گیری و cDNA توسط کیت پارس توس (مشهد، ایران) سنتز شد. سپس از cDNA برای ارزیابی

2- $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد [۲۱]. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer sequence	Nucleotide count
CHOP	For: 5'- GAAAGCAGAAACCGGTCCAAT-3'	21
	Rev: 5'- GGATGAGATATAGGTGCCCCC-3'	21
GAPDH	For: 5'- CACTGAGCATCTCCCTC ACAA-3'	22
	Rev: 5'- TGGTATTCGAGAGA AGGGAGG-3'	22

روش‌های آماری

ابتدا از آزمون کالموگروف-اسمیرنوف برای تعیین نرمالیتی توزیع داده‌های پژوهش استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها در متغیرها، از آزمون پارامتریک آنوای یک‌طرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفته است. سطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل آماری تحقیق حاضر، $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شده است.

و گروه ۳ روز تمرین در هفته پایین‌ترین مقدار AST با میزان $(213/63 \pm 78/61)$ را در بین همه گروه‌ها داشتند. همچنین بالاترین و پایین‌ترین مقدار آنزیم ALT به ترتیب متعلق به گروه کنترل $(197/101 \pm 62/95)$ و گروه گرسنگی $(58/5 \pm 44/87)$ نشان داده شده است. بالاترین و پایین‌ترین مقدار آنزیم CHOP به ترتیب متعلق به گروه ۳ روز تمرین $(1/0 \pm 22/46)$ و گروه گرسنگی+ ۵ روز تمرین $(0/13 \pm 0/20)$ است.

یافته‌ها

داده‌های توصیفی متغیرهای پژوهش حاضر در جدول ۴ نشان داده است که گروه کنترل بالاترین مقدار AST با میزان

جدول ۴- میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای پژوهش

متغیرهای پژوهش	گروه‌های پژوهش		
	CHOP	ALT	AST
کنترل	$1/0 \pm 0/00$	$197/101 \pm 62/95$	$465/130 \pm 94/75$
گرسنگی	$0/0 \pm 38/30$	$58/5 \pm 44/87$	$221/40 \pm 48/85$
۳ روز تمرین	$1/0 \pm 22/46$	$119/23 \pm 24/92$	$213/63 \pm 78/61$
۵ روز تمرین	$0/0 \pm 38/29$	$100/44 \pm 88/54$	$223/64 \pm 14/49$
گرسنگی+ ۳ روز تمرین	$0/0 \pm 28/29$	$71/15 \pm 0/290$	$237/52 \pm 68/34$
گرسنگی+ ۵ روز تمرین	$0/0 \pm 13/20$	$66/10 \pm 98/05$	$141/89 \pm 42/77$

تمرین $(P=0/001)$ ، ۵ روز تمرین $(P=0/001)$ ، گرسنگی+ ۳ روز تمرین $(P=0/002)$ و گرسنگی+ ۵ روز تمرین $(P=0/0001)$ نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری (کاهش) وجود داشت؛ همچنین آزمون تعقیبی LSD برای آنزیم کبدی ALT نشان داد که بین گروه‌های گرسنگی $(P=0/001)$ ، ۵ روز تمرین $(P=0/05)$ ، گرسنگی+ ۳ روز تمرین $(P=0/004)$ و گرسنگی+ ۵ روز تمرین

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه در جدول ۵ نشان می‌دهد که رابطه معناداری بین مقدار آنزیم‌های $AST (F=9/75, P=0/0001)$ ، $CHOP (F=10/55, P=0/0001)$ و $ALT (F=6/08, P=0/001)$ وجود دارد که با توجه به وجود رابطه معنادار بین همه متغیرهای پژوهشی، آزمون تعقیبی LSD برای آنزیم کبدی AST نشان داد که بین گروه‌های گرسنگی $(P=0/001)$ ، ۳ روز

وجود داشت. همچنین بین گروه ۳ روز تمرین ($P=0/003$) نسبت به گروه گرسنگی تفاوت معنی‌داری (افزایش) وجود داشت. از طرفی بین گروه ۳ روز تمرین نسبت به ۵ روز تمرین ($P=0/003$)، گرسنگی+۳ روز تمرین ($P=0/001$) و گرسنگی+۵ روز تمرین ($P=0/0001$) تفاوت معنی‌داری (افزایش) وجود داشت.

نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری (کاهش) وجود داشت. در نهایت آزمون تعقیبی LSD برای بیان ژن CHOP نشان داد که بین گروه‌های گرسنگی ($P=0/05$) (کاهش)، ۳ روز تمرین ($P=0/003$) (افزایش)، گرسنگی+۳ روز تمرین ($P=0/01$) (کاهش) و گرسنگی+۵ روز تمرین ($P=0/002$) (کاهش) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری

جدول ۵- نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه معنی‌داری گروه‌ها

گروه	تمرین	گرسنگی	AST	ALT	CHOP
AST	برون‌گروهی	۵	۶۱۴۱۶/۲۴	۳۰۷۰۸۱/۲۴	۹/۷۵
	درون‌گروهی	۲۴	۶۲۹۵/۳۰	۱۵۱۰۸۷/۲۳	*۰/۰۰۱
ALT	برون‌گروهی	۵	۱۳۵۲۴/۴۹	۶۷۶۲۲/۴۹	۶/۰۸
	درون‌گروهی	۲۴	۲۲۲۳/۴۵	۵۳۳۶۲/۸۷	*۰/۰۰۱
CHOP	برون‌گروهی	۵	۰/۹۵	۴/۷۸	۱۰/۵۵
	درون‌گروهی	۲۴	۰/۰۹	۲/۱۷	*۰/۰۰۱

* وجود تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵

بحث

در تحقیقی نظامند و فراتحلیل توسط Kazeminasab و همکاران (۲۰۲۳) اثر تمرین‌های ورزشی بر آنزیم‌های کبدی ALT و AST در بزرگسالان مبتلا به بیماری‌های کبدی بررسی شد. در این تحقیق فراتحلیل بررسی ۳۶ مطالعه نشان داد که تمرین‌های ورزشی منجر به کاهش ALT و AST می‌شود. این محققان براساس نتایج خود بهبود عملکرد کبد را از طریق نقش مهم تمرین ورزشی (تمرین هوازی، مقاومتی و ترکیبی) نشان دادند. به طوری که هر سه نوع تمرین هوازی، مقاومتی و ترکیبی به‌عنوان یک راهکار غیردارویی برای تنظیم آنزیم‌های کبدی پیشنهاد شد [۲۲]. نتایج مطالعه فراتحلیل Kazeminasab و همکاران با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا است؛ زیرا در هر دو تحقیق ما شاهد اثرگذاری (کاهش) تمرین هوازی بر روی آنزیم‌های کبدی در آزمودنی‌ها هستیم. این از نقش بالقوه انجام تمرین ورزشی هوازی و سایر تمرین‌های ورزشی برای تنظیم آنزیم‌های کبدی ALT و AST حمایت می‌کند. از عامل مؤثر دیگر در تحقیق حاضر علاوه بر تمرین ورزشی اعمال گرسنگی بر آزمودنی‌ها بود. اعمال گرسنگی همراه با انجام تمرین ورزشی تأثیر بسزایی بر کاهش آنزیم‌های ALT و AST گذاشته است و همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد این تأثیرگذاری در گروه‌های گرسنگی+۳ روز تمرین و گرسنگی+۵ روز تمرین بسیار قابل توجه است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های پژوهش حاضر در میزان AST، ALT و CHOP نشان داد. این تفاوت برای آنزیم کبدی AST کاهش معنی‌دار بین گروه‌های گرسنگی، ۳ روز تمرین، ۵ روز تمرین، گرسنگی+۳ روز تمرین و گرسنگی+۵ روز تمرین نسبت به گروه کنترل بود. همچنین برای آنزیم کبدی ALT کاهش معنی‌داری بین جفت گروه‌های گرسنگی، ۵ روز تمرین، گرسنگی+۳ روز تمرین و گرسنگی+۵ روز تمرین نسبت به گروه کنترل نشان داده شد. برای بیان ژن CHOP، کاهش معنی‌داری بین گروه‌های گرسنگی، گرسنگی+۳ روز تمرین و گرسنگی+۵ روز تمرین و افزایش ۳ روز تمرین نسبت به گروه کنترل بود. همچنین بین گروه ۳ روز تمرین نسبت به گروه گرسنگی افزایش معنی‌داری وجود داشت. از طرفی بین گروه ۳ روز تمرین نسبت به ۵ روز تمرین، گرسنگی+۳ روز تمرین و گرسنگی+۵ روز تمرین افزایش معنی‌داری وجود داشت. تمرین‌های ورزشی از تأثیر گذاری مؤثر بر آنزیم‌های کبدی به ویژه ALT و AST در کبد حمایت می‌کند و نشان داده شده است که تمرین‌های ورزشی می‌تواند یک راهبرد توصیه‌ای برای سلامت و بهبود سلول‌های بافت کبد باشد. در این راستا

در راستای تنظیم اثرگذار بر آنزیم‌های کبدی در تحقیقی دیگر Moslehi و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی تأثیر تمرین هوازی بر آنزیم‌های کبدی ALT و AST در رت‌های چاق پرداختند. تمرین ورزشی هوازی به مدت هشت هفته، چهار جلسه در هفته با ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی انجام شد. سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST به سمت مقادیر پایه تفاوت معنی‌داری را نشان داد. این محققان بیان کردند که تمرین هوازی می‌تواند به‌عنوان یکی از راه‌های تغییر در متابولیسم کبدی و سلامت سیستم قلبی‌عروقی در درمان بیماری‌های مرتبط با متابولیک و قلبی‌عروقی ناشی از بی‌حرکی و چاقی مورد توجه قرار گیرد [۲۳]. نتایج تحقیق Moslehi و همکاران نیز هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر است که در هر دو تحقیق ما شاهد کاهش آنزیم‌های کبدی و تنظیم اثرگذار هستیم. تمرین‌های ورزشی به‌ویژه تمرین‌های هوازی با افزایش متابولیسم کبدی می‌تواند آنزیم‌های آن را در محدوده نرمال و طبیعی قرار دهد و این از سلامت کبدی از طریق تمرین‌های ورزشی حمایت می‌کند. با وجود تفاوت‌های در تحقیق‌های گزارش شده و تحقیق حاضر از نظر شرایط سالم یا بیمار بدون آزمودنی‌ها، شرایط تمرینی (شدت، نوع و مدت زمان) ما شاهد افزایش سلامت متابولیسم کبدی از طریق فعالیت‌های ورزشی هستیم. در تحقیق Moslehi و همکاران آزمودنی‌ها چاق هستند و تمرین هوازی به مدت ۸ هفته توانست سطوح آنزیم‌های کبدی را کاهش دهد. شرایطی مانند گرسنگی هستند که متابولیسم کبد و متابولیسم کل بدن را افزایش می‌دهند و این دو شرایط یعنی انجام تمرین‌های ورزشی و گرسنگی که در بعضی تحقیقات به‌عنوان روزه‌داری یاد می‌شود بسیار در شرایط متابولیکی بدن تأثیرگذار هستند؛ بنابراین علاوه بر انجام تمرین‌های ورزشی تنظیم‌های غذایی نیز می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی مؤثر مد نظر قرار گیرد.

نتایج بررسی مطالعات نشان می‌دهد که انواع ورزش‌های هوازی به‌صورت مداوم، تناوبی و ترکیبی باعث بهبود سطوح آنزیم‌های کبدی می‌شود. یکی از شرایط تمرینی که می‌تواند بسیار تأثیرگذار باشد مدت‌زمان تمرین‌های ورزشی است [۱۷]. سایر عوامل، یعنی تکرارها، شدت، حجم و پیشرفت برنامه‌های تمرینی نیز می‌تواند بر آنزیم‌های کبدی تأثیرگذار باشد [۱۸].

از نظر تأثیرگذاری انواع تمرین‌های ورزشی در تحقیقی دیگر Silva و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی میزان تأثیر ورزش هوازی و مقاومتی بر رفتار آنزیم‌های AST و ALT پرداختند. پروتکل مطالعه بین تمرین هوازی و تمرین مقاومتی با تکرارهای هفتگی بین ۲ تا ۶ بار در هفته، مدت زمان ۲۰ تا ۹۰ دقیقه برای هوازی و شدت بین ۵۰ تا ۸۰ درصد از حداکثر VO₂ و/یا حداکثر HR برای تمرین مقاومتی بود. این محققان بیان کردند که تمرین‌های ورزشی نمی‌تواند تغییرات قابل‌توجهی در رفتار پارامترهای کبدی ALT و AST ایجاد کند [۱۸]. بنابراین با وجود بررسی‌های فراوان بر روی رفتار آنزیم‌های کبدی هنوز به درک کلی از این عوامل مهم در سلاکت کبدی به دست نیامده است. در کل شرایط تمرینی، محیطی، آزمودنی‌ها و غیره بر روی رفتار این آنزیم‌ها بسیار تأثیرگذار هستند.

فعالیت‌های ورزشی می‌تواند سلامت سلول‌های کبدی را تضمین کند. فعالیت‌های ورزشی با تنظیم مسیر آپوپتوز می‌تواند بر سلامت کبد نظارت داشته باشد. در ارتباط با تأثیر تمرین‌های ورزشی بر عوامل سلولی مرتبط با تنظیم آپوپتوز در تحقیق Guarino و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی تأثیر تمرین ورزشی بر بافت کبد آزمودنی‌های مبتلا به بیماری پرداختند. فعالیت ورزشی ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته و مدت زمان ۶۰ دقیقه برای هر جلسه انجام شد. نتایج افزایش محتوای CHOP را نشان داد. در مقابل تمرین ورزشی منجر به کاهش معنی‌دار ALT و AST شد [۲۴]. CHOP یکی از عوامل مهم مرتبط با آپوپتوز است که می‌تواند منجر به مرگ بیش از حد در بافت کبد شود. در تحقیق Guarino و همکاران ما شاهد افزایش آن هستیم و در همین راستا در تحقیق حاضر ۳ روز تمرین همانند منجر به افزایش بیان ژن CHOP نسبت به گروه کنترل شد. اما در مقابل عامل گرسنگی به تنهایی و همراه با تمرین ورزشی در تحقیق حاضر بیان ژن CHOP را کاهش داد. در تحقیق حاضر کاهش معنی‌داری بین گروه‌های گرسنگی، گرسنگی + ۳ روز تمرین و گرسنگی + ۵ روز تمرین نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. از عوامل بسیار مهم و تأثیرگذار نوع آزمودنی‌ها است. در تحقیق حاضر آزمودنی‌ها سالم بودند و این درحالی است که در تحقیق Guarino و همکاران آزمودنی‌ها بیمار بودند. بیماری می‌تواند عاملی برای تغییر بافت یا مرگ سلولی بافتی در یک اندام مانند کبد شود.

پروتئین CHOP به دنبال تمرین هوازی تمایل به افزایش داشت و این درحالی است که همراه با اعمال گرسنگی کاهش یافت. بنابراین انجام تمرین هوازی همراه با گرسنگی می‌تواند با کاهش بیان ژن CHOP، آپوپتوز سلولی بافت کبد را کاهش دهد. بنابراین با توجه به نقش این پروتئین در واسطه سیگنال‌دهی UPR و کاهش استرس در ER، می‌تواند در حفظ عملکرد طبیعی سلول‌های کبدی تأثیر گذار باشد. تأثیر مثبت تمرین ورزشی هوازی و گرسنگی در بهبود این آنزیم‌های کبدی می‌تواند از ابتلای افراد سالم به بیماری‌های کبدی جلوگیری کند.

سیاسگزاری

این مقاله حاصل رساله دکتری است که توسط نویسندگان در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی‌آباد کتول و دانشگاه علوم پزشکی گرگان انجام شده است. از تمامی عزیزانی که در این امر مهم ما را یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

همچنین نشان داده شده است که فعالیت‌های ورزشی با شدت متوسط از نوع هوازی می‌تواند باعث کاهش عوامل مرتبط با UPR مانند JNK1, PERK, IRE-1 α و CHOP شود که این کاهش می‌تواند آپوپتوز سلول‌های کبدی را کاهش دهد [۲۵]. در این راستا در تحقیقی دیگر انجام تمرین هوازی به صورت منظم به مدت ۸ هفته با کاهش CHOP منجر به کاهش آپوپتوز سلول‌های کبدی شد [۱۳]. در این دو تحقیق نشان داده شد که تمرین‌های ورزشی هوازی آپوپتوز هپاتوسیت را از طریق مسیرهای IRE-1 α /JNK و PERK/CHOP کاهش می‌دهند [۲۶]. در تحقیقی دیگر تأثیر شدت‌های مختلف تمرین ورزشی بر آپوپتوز هپاتوسیت در رت‌هایی با مشکلات کبدی بررسی شد. تمرین ورزشی در شدت‌های مختلف با مهار سازکارهای مسیرهای سیگنالینگ استرس شبکه اندوپلاسمیک از طریق مسیرهای IRE1/JNK و eIF2 α /CHOP منجر به بهبود سلول‌های کبد شد [۱۴]. در راستا با نتایج تحقیق‌های گزارش شده نتایج تحقیق حاضر نیز با کاهش بیان ژن CHOP از طریق تمرین ورزشی و اعمال گرسنگی منجر به بهبود عملکرد و سلامت سلول‌های کبدی شد. به احتمال فراوان با مهار عملکرد CHOP، عملکرد عوامل پایین‌دستی نیز مهار می‌شود. یکی از این عوامل ER اکسیداز α (ERO1 α)^۱ است که یک هدف پایین‌دستی CHOP است و در تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)^۲ نقش دارد. CHOP بیان ERO1 α را القاء می‌کند که تولید ROS را افزایش می‌دهد و آزادسازی کلسیم با واسطه گیرنده اینوزیتول-۱، ۴، ۵-تری فسفات (IP3R)^۳ را از ER تحریک می‌کند و باعث مرگ سلولی می‌شود [۲۷]. بنابراین با مهار CHOP این سیگنالینگ مهار می‌شود و از آپوپتوز بیش از حد سلولی‌های کبدی جلوگیری می‌شود [۲۸].

نتیجه گیری

در نهایت نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین‌های هوازی و گرسنگی به تنهایی یا همراه با هم می‌توانند سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST را کاهش دهند. این کاهش می‌تواند در سلامت کبد تأثیر به‌سزایی داشته باشد. همچنین بیان ژن

^۱ ER Oxidase 1 α

^۲ Reactive Oxygen Species

^۳ Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor

مآخذ

- Marciniak SJ, Chambers JE, Ron D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2022; 21(2):115-40.
- Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences*. 2016; 73:79-94.
- Zhang J, Guo J, Yang N, Huang Y, Hu T, Rao C. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury. *Cell Death & Disease*. 2022; 13(12):1051.
- Ajoolabady A, Kaplowitz N, Lebeaupin C, Kroemer G, Kaufman RJ, Malhi H, et al. Endoplasmic reticulum stress in liver diseases. *Hepatology*. 2022. 77(2): 619-639
- Liu X, Green RM. Endoplasmic reticulum stress and liver diseases. *Liver Research*. 2019; 3(1):55-64.
- Duwaerts CC, Maiers JL. ER Disposal Pathways in Chronic Liver Disease: Protective, Pathogenic, and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022:1214.
- Wang P, Li J, Tao J, Sha B. The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*. 2018; 293(11):4110-21.
- Sun Z, Brodsky JL. Protein quality control in the secretory pathway. *Journal of Cell Biology*. 2019; 218(10):3171-87.
- Safdar A, Saleem A, Tarnopolsky MA. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016; 12(9):504-17.
- Keating SE, George J, Johnson NA. The benefits of exercise for patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2015; 9(10):1247-50.
- Tsunoda K, Kai Y, Kitano N, Uchida K, Kuchiki T, Nagamatsu T. Impact of physical activity on nonalcoholic steatohepatitis in people with nonalcoholic simple fatty liver: a prospective cohort study. *Preventive Medicine*. 2016; 88:237-40.
- Fealy CE, Haus JM, Solomon TP, Pagadala M, Flask CA, McCullough AJ, et al. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Applied Physiology*. 2012;113(1):1-6.
- Goncalves IO, Passos E, Diogo CV, Rocha-Rodrigues S, Santos-Alves E, Oliveira PJ, et al. Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2016; 41(3):298-306.
- Ruan L, Li F, Li S, Zhang M, Wang F, Lv X, Liu Q. Effect of different exercise intensities on hepatocyte apoptosis in HFD-induced NAFLD in rats: the possible role of endoplasmic reticulum stress through the regulation of the IRE1/JNK and eIF2 α /CHOP signal pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021; ID 6378568.
- Da Ponte IM, de Sousa Lima ME, Albuquerque MC, de Holanda Veloso AF, Bachur TP. Esteato-hepatite não alcoólica: uma síndrome em evidência. *Brazilian Journal of Health Review*. 2020; 3(1):1077-93.
- Del Valle Díaz S, Martínez MP, Vega JA, Fonden JD. Hepatic disease due to fat deposit. *Medisan*. 2015; 19(07):886-96.
- Silva M, Santos F, Lagares L, Macedo R, Takanami L, Almeida L, et al. Physical Exercise and Changes in AST/ALT Rates in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic. *Review of Clinical Trials*. Preprints 2023; 2023040318.
- Ezpeleta M, Gabel K, Cienfuegos S, Kalam F, Lin S, Pavlou V, et al. Effect of alternate day fasting combined with aerobic exercise on non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Cell Metabolism*. 2023; 35(1):56-70.
- Alex S, Boss A, Heerschap A, Kersten S. Exercise training improves liver steatosis in mice. *Nutrition & metabolism*. 2015; 12(1):1-1.
- Malinowski B, Zalewska K, Wesierska A, Sokołowska MM, Socha M, Liczner G, et al. Intermittent fasting in cardiovascular disorders—an overview. *Nutrients*. 2019; 11(3):673.
- Asgharpour H, Rezaeeshirazi R. The Effect of four Weeks of Continuous Aerobic Training and Starvation on the Expression of Gene Pink1 and Bnip3 in liver Tissue, liver Enzymes and lipid profile in Wistar Fatty Model Rats. *Jorjani Biomedicine Journal*. 2022; 10(3):15-25.
- Kazeminasab F, Shojaei M, Khalafi M. The impact of exercise training on liver enzymes and liver fat content in adults with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2023; 22(6) :342-360
- Moslehi E, Minasian V, Sadeghi H. The Effect of Aerobic Exercise on Attenuates of High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver, Insulin Resistance and Epicardial Fat Mass in Male Wistar Rat. *Armaghane Danesh*. 2020; 25(1) :55-68
- Guarino M, Kumar P, Felser A, Terracciano LM, Guixé-Muntet S, Humar B, et al. Exercise attenuates the transition from fatty liver to steatohepatitis and reduces tumor formation in mice. *Cancers*. 2020; 12(6):1407.
- Ruan L and Li F. Endoplasmic reticulum stress mechanism of exercise training and resveratrol protection against hepatocyte apoptosis in NAFLD rats. *Journal of Sports Science*. 2016; 36: 56–66.
- Li J, Sun J, Li E, Zhongyang Z, and Quansheng S. Effects of exercise and diet adjustment on endoplasmic reticulum stress mediated hepatocyte apoptosis in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Chinese Journal of Sports Medicine*. 2017; 36: 36–43.
- Spina A, Guidarelli A, Fiorani M, Varone E, Catalani A, Zito E, et al. Crosstalk between ERO1 α and ryanodine receptor in arsenite-dependent mitochondrial ROS formation. *Biochemical Pharmacology*. 2022; 198:114973.
- Lei Y, Wang S, Ren B, Wang J, Chen J, Lu J, et al. CHOP favors endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of autophagy. *PLoS One*. 2017; 12(8): e0183680.

The Effect of a Period of Aerobic Training with Different Number of Days Along with Starvation on The Function of Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein in the Liver of Healthy Wistar Model Rats

Monireh Khalili¹, Habib Asgharpour^{1*}, Asra Askari², Jahanbakhsh Asadi³

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

2. Department of Physical Education and Sport Sciences, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

3. Metabolic Disorders Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

ABSTRACT

Background: The health and proper functioning of the endoplasmic reticulum in the liver can lead to an increase in the quality of the metabolism of liver cells. Exercise can lead to liver health by regulating liver enzymes and factors related to apoptosis pathway. Therefore, the aim of the current research is to compare the performance of the endoplasmic reticulum chaperone protein of the liver of healthy model rats with the intervention of different training sessions and starvation.

Methods: In this experimental research, 30 Wistar male rats with a weight range of 330 ± 25 grams were selected and divided into six groups: 1) control, 2) starvation, 3) 3 days of training per week, 4) 5 days of training per week, 5) starvation + 3 training days per week, 6) starvation + 5 training days per week. Training consisted of one hour of continuous running on a treadmill for 4 weeks, and starvation was performed for 14 hours when the rats were awake. Data analysis was performed using one-way analysis of variance and post hoc LSD statistical tests in SPSS version 23 software. A significance level of $P \leq 0.05$ was considered.

Results: Data analysis showed a significant change in the levels of liver enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) ($P \leq 0.05$). This change in CHOP gene expression was also significant ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Aerobic training for 3 and 5 days with starvation can lead to liver health by reducing liver enzymes (AST and ALT) and cell death-related factor (CHOP) through the apoptosis pathway.

Keywords: Starvation, Aerobic Exercise, Liver Enzymes, Chaperone Gene Expression, Endoplasmic Reticulum

* Islamic Azad University, Aliabad Katoul Branch, University Blvd, Aliabad Katoul, Golestan, Iran. Tel: +989113922124, Habibasgharpour@gmail.com

