مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۹، شهریور ۱۳۹۹، ۶۳۲-۶۱۹

اثر طولانی مدت غذای پرچرب و تمرین منظم هوازی بر بیان ایزوفرم‌های یک و دو کراتین کیناز میتوکندری (CKmt1,2) در بافت چربی سفید موش سوری: یک مطالعه تجربی

سعید دانش‌یار[۱]، علیرضا پوینده روان[۲]، امیر خسروی[۳]، یزدان فروتن[۴]

دریافت مقاله: ۹۹/۲/۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۹/۳/۲۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۹/۴/۲۲ پذیرش مقاله: ۹۹/۴/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: کراتین کیناز میتوکندری در گرمازایی مستقل از پروتئین غیر جفت کننده نقش دارد. تصور می‌شود، این عامل بر اثر تغذیه و ورزش متأثر شود. هدف از این پژوهش تعیین اثر مصرف طولانی مدت غذای پرچرب و تمرین ورزشی منظم هوازی بر بیان ایزوفرم‌های یک و دو کراتین کیناز میتوکندری (CKmt1,2) در بافت چربی سفید موش سوری بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۸ سر موش سوری نر (C57BL/6) در چهار گروه کنترل (۷ سر)، غذای پرچرب (۷ سر)، تمرینی (۷ سر) و غذای پرچرب- تمرینی (۷ سر) تقسیم شدند. موش‌های گروه‌های غذای پرچرب به مدت ۱۲ هفته، با غذای پرچرب (۴۰ درصد) تغذیه شدند. موش‌های گروه‌های تمرینی، به مدت شش هفته، تحت تمرین تداومی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌های CKmt1 و CKmt2 از روش Real time PCR استفاده شد. برای تحلیل آماری داده‌ها از آزمون ANOVA دو طرفه استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که غذای پرچرب (P=۰/۳۲۴) و تمرین ورزشی (P=۰/۱۳۶) تأثیر معنی‌داری در بیان ژن CKmt1 ندارد. با این حال، بیان ژن CKmt2 بر اثر غذای پرچرب، کاهش معنی‌دار (P=۰/۰۴۳) و بر اثر تمرین ورزشی افزایش معنی‌داری (P=۰/۰۰۱) نسبت به گروه پرچرب داشت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه دلالت بر این دارند که مصرف طولانی مدت غذای پرچرب و تمرین منظم به ترتیب از طریق کاهش و افزایش بیان کراتین کیناز میتوکندری احتمالاً می‌توانند گرمازایی غیرلرزشی در بافت چربی سفید را متأثر سازند.

واژه‌های کلیدی: چاقی، غذای پرچرب، گرمازایی، بافت چربی سفید، موش سوری

۱- (نویسنده مسئول) استادیار فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره)، لرستان، ایران
تلفن: ۰۶۶-۴۲۴۶۸۳۲۰، دورنگار: ۰۶۶-۴۲۴۶۸۳۲۱، پست الکترونیکی: s.daneshyar@abru.ac.ir
۲- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی در دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران
۳- استادیار فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره)، لرستان ایران
۴- کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آزاد همدان (واحد اسدآباد)، همدان، ایران

مقدمه

سبک زندگی امروزی با افزایش مصرف غذاهای پرچرب و کاهش فعالیت فیزیکی همراه شده است که با عوارض متابولیکی همچون چاقی و سندرم متابولیک همراه شده است [۱]. برای مقابله با چاقی، کاهش دریافت کالری و افزایش مصرف کالری توصیه می‌شود [۲]. به منظور کاهش دریافت انرژی، عمدتاً داروهای کاهش دهنده اشتها تجویز می‌شود، با این حال این داروها چندان موثر نبوده‌اند و با عوارض جانبی همراه هستند [۳]. ازاین‌رو، رویکرد افزایش مصرف انرژی بی‌شتر مورد توجه قرار گرفته است [۴]. در دهه اخیر، پژوهش‌گران به‌دنبال یافتن محرک‌های ماکرومولکولی به منظور افزایش مصرف انرژی به صورت گرمازایی هستند. گرمازایی غیر لرزشی (non-shivering) در چربی قهوه‌ای و بافت چربی بژ (Beige) نقش مهمی در مصرف انرژی بدن دارد [۶-۵].

تصور بر این بود که بافت چربی قهوه‌ای صرفاً در دوران نوزادی و در منطقه بین کتفی واقع می‌شود و با افزایش سن به‌سرعت از بین می‌رود، اما در دهه‌های اخیر کشف جدید و جالبی صورت گرفت که نقطه عطف جدید در زمینه‌ی متابولیسم بدن رقم زد [۷]. پژوهش‌گران از طریق پرتونگاری مشاهده کردند که افراد بزرگ‌سال دارای چربی قهوه‌ای هستند که در نواحی گردن و بالای ترقوه پراکنده است [۹-۸]. اگرچه مقدار این چربی در بدن اندک است، با این حال به دلیل داشتن قابلیت مصرف انرژی از طریق گرمازایی غیرلرزشی [۱۱-۱۰] برای درمان چاقی و سندرم متابولیک مورد توجه قرار گرفته است [۱۲]. مطالعات نشان داده‌اند، برخی از سلول‌های قهوه‌ای در بزرگ‌سالان، ویژگی‌های مولکولی مشابه سلول‌های بژ یا بریت (Brite) موجود در بافت چربی سفید دارند [۱۴-۱۳].

تا چند سال اخیر تصور می‌شد، تنها عامل تنظیمی گرمازا در ادیپوسایت قهوه‌ای و بژ، پروتئین غیر جفت کننده نوع یک(uncoupling protein1; UCP1) است [۱۵]. اما به‌تازگی سازوکار گرامازایی مستقل از UCP1 کشف شده است [۱۶]. این سازوکار مربوط به کراتین (creatine) درون سلولی است [۱۷]. Kazak و همکارن نشان دادند که کراتین موجود در ادیپوسایت‌های قهوه‌ای و بژ، نقش مهمی در گرمازایی غیرلرزشی دارد [۱۸]. عوامل کلیدی در این سازوکار، کراتین کینازهای میتوکندری هستند (mitochondrial creatine kinase; CKmt1,2). کراتین کینازهای میتوکندری، با اخذ فسفات از ATP (Adenosine Triphosphate) و انتقال آن به کراتین، موجب جریان افتادن چرخه بیهوده و در نتیجه هدر رفتن انرژی از طریق رها شدن فسفات پر انرژی از کراتین فسفات می‌شود [۱۸]. نقش این سازوکار در گرمازایی ناشی از سرما، محرک بتا آدرنرژیک و تغذیه و مهم‌تر این‌که نقش آن در مقابله با چاقی ثابت شده است [۲۱-۱۹]. اهمیت این سازوکار زمانی بیش‌تر شد که برای اولین بار از طریق تکنیک پچ کلامپ (Patch clamp)، سلول‌های چربی شناسایی شدند که با وجود نداشتن UCP1 دارای سازوکار کراتین فسفات بودند که به عنوان سلول‌های گرمازای بدون UCP1 نامگذاری شدند [۲۲].

سوال مهمی که مطرح است این‌که چه محرک‌های بیرونی می‌توانند سازوکار کراتین فسفات را در بافت چربی فعال کنند؟ مطالعات نشان داده‌اند، بر اثر سرما و محرک بتا آدرنرژیک بیان CKmt2 افزایش می‌یابد [۲۲، ۱۸]. هم-چنین، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد، متابولیسم بدن به ویژه گرمازایی غیرلرزشی در بافت چربی قهوه‌ای و بژ، بر اثر مصرف غذای پرچرب و هم‌چنین تمرینات ورزشی متأثر می‌شوند [۲۴-۲۳]. با این حال، تاکنون، اثر مصرف طولانی مدت غذای پرچرب و تمرینات منظم ورزشی را بر سازوکار گرمازایی ناشی از کراتین فسفات مطالعه نشده است. از این حیث، بررسی اثر این عوامل بر مکانیسم‌های گرمازایی ناشی از کراتین کیناز ارزشمند است. بنابراین، هدف از این پژوهش، تعیین اثر ۱۲ هفته مصرف غذای پرچرب و شش هفته پروتکل تمرین ورزشی هوازی بر میزان بیان ایزوفرم یک و ایزوفرم دو کراتین کیناز میتوکندری ($CKmt_{1,2}$) در بافت چربی سفید است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی با اعمال مداخله‌ها بر موش های آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه لرستان انجام شد. ۲۸ سَر موش سوری نر نژاد C57BL/6 در سن ۴ هفته و با وزن تقریبی ۱۲ گرم از مرکز مطالعات تجربی و مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری شدند. روش نگه‌داری و اعمال مداخله بر روی موش‌ها بر اساس آئین نامه اجرایی اصول اخلاقی در پژوهش‌های علوم پزشکی (راهنمای اخلاق پژوهش بر حیوانات) برای انجام اهداف علمی و آزمایشگاهی با تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه آیت اله بروجردی با شناسه ABRU.AC.IR/15664-96.43 انجام شد. نمونه‌ها تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند. در طول نگه‌داری حیوانات، آب و غذای استاندارد موش (شرکت خوراک دام به‌پرور کرج) به میزان دلخواه در اختیار آن‌ها گذاشته شد. آزمودنی‌ها پس از همسان سازی وزن به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل (۷ سر)، غذای پرچرب (۷ سر)، تمرین ورزشی (۷ سر) و غذای پرچرب و تمرینی (۷ سر) تقسیم شدند. پس از یک هفته آشناسازی با محیط، موش‌ها تحت مداخله‌های پژوهش قرار گرفتند [۲۵].

موش‌های گروه غذای پرچرب، از سن پنج هفتگی تا انتهای پروتکل پژوهش (سن ۱۷ هفته) یعنی ۱۲ هفته، با غذای پرچرب تغذیه شدند. غذای پرچرب شامل ۴۲ درصد چربی (کیلوکالری)، ۴۰ درصد کربوهیدرات (کیلوکالری) و ۱۸ درصد پروتئین (کیلوکالری) بود [۲۵]. به دلیل نبود پلت‌های آماده غذای پرچرب، قرص‌های غذایی توسط شرکت دام طیور ساخته شد. موش‌های گروه کنترل با غذای استاندارد موش‌ها تغذیه شدند که شامل ۱۵ درصد چربی (کیلوکالری)، ۲۵ درصد پروتئین (کیلوکالری) و ۶۰ درصد کربوهیدرات (کیلو کالری) بود [۲۶].

موش‌های گروه تمرین ورزشی، از سن ۱۱ تا انتهای پروتکل پژوهش (سن ۱۷ هفته) تحت تمرین ورزشی قرار گرفتند. تمرین ورزشی تجویز شده در این پژوهش در برگیرنده‌ی دویدن بر روی نوارگردان ویژه موش (شرکت

پیشرو اندیشه صنعت، مدل SDR148، ساخت ایران) با شیب صفر درجه، به مدت شش هفته و هفته‌ای پنج جلسه بود که به تمرین استقامتی تداومی نیز معروف است [۲۵]. این پروتکل تمرینی بر اساس افزایش تدریجی بار تمرینی شامل شدت (سرعت) و حجم (مدت) تمرین طراحی شد. به طور خلاصه، موش‌ها در هفته اول با سرعت ۱۴ متر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه دویدند و هفته ششم با سرعت ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه [۲۷].

موش‌های گروه غذای پرچرب-تمرین ورزشی، از سن پنج هفتگی تا انتهای پروتکل پژوهش (سن ۱۷ هفته) یعنی ۱۲ هفته غذای پرچرب مصرف کردند و از سن ۱۱ تا انتهای پروتکل پژوهش (سن ۱۷ هفته) یعنی شش هفته، علاوه بر ادامه مصرف غذای پرچرب، تحت تمرین ورزشی قرار گرفتند [۲۶].

وزن موش‌ها به صورت هفتگی در طول دوره‌ی پژوهش از طریق ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ (ENTRIS 3202-1S S, Artorius, Germany) اندازه‌گیری شدند و در چهار نقطه زمانی یعنی شروع و پایان پروتکل و قبل و پس از اعمال مداخله‌ها گزارش شدند [۲۶].

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از یک شب ناشتایی، حیوانات از طریق تزریق درون صفاقی کتامین (۲۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۳۰ میلی گرم/کیلوگرم) بی‌هوش و کشته شدند. در عمل تشریح، چربی زیرپوستی ناحیه کشاله ران آن‌ها برداشته و فریز (۸۰- سانتی‌گراد) شدند [۲۸].

برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های کراتین کیناز میتوکندری (ایزوفرم یک) (CKmt1) و کراتین کیناز میتوکندری (ایزوفرم دو) (CKmt2) از روش Real-Time RT-PCR استفاده شد که طبق مراحل ذیل انجام شد.

در ابتدا، پرایمر ژن‌های CKmt1، CKmt2 و HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) به عنوان ژن خانه گردان، توسط شرکت سیناکلون (ایران) سنتز شد. توالی پیش و پس پرایمر ژن‌های مورد پژوهش به این صورت بود [۲۲]:

CKmt1: Forward: *GGCCTCAAAGAGGTGGAGAA*, Reverse: *CAGGATCTTTGGGAAGCGGT*
CKmt2: Forward: *GCATGGTGGCTGGTGATGAG*, Reverse: *AAACTGCCCGTGAGTAATCTTG*
HPRT: Forward: *CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG*, Reverse: *TTCAACACTTCGAGAGGTCCT*

RNAی بافت چربی طبق دستورالعمل کیت ترایزول (TRIzol™ Reagent, *Thermo fisher Scientific, US*) استخراج شد. به‌طور خلاصه ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌ی بافت چربی، پس از افزودن یک میلی‌لیتر محلول ترایزول، از طریق دستگاه هم‌زن هموژن شد-*Overhead stirrers, AT*) *analogica, FALC, Italy*) بافت هموژن شده در دوره‌های متفاوت سانتریفوژ شد *(Centrifuge, MIKRO 200R, Hettich, Germany)* که محصول آن تشکیل رسوب حاوی RNA بود که پس از اضافه کردن آب دپس *(-DEPC treated Wate -Thermo Scientific-US)* به مدت ۱۰ دقیقه درون دستگاه ترموبلاک (*Thermoblock, TD 200 P1, FALc, Italy*) در دمای $55^{\circ}C$ آنکوبه شد *(Incubator, Stat Fax 2200, MIDSCI,* US). در مرحله آخر، کمیت و کیفیت

RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ *(Ultrospec 3000, pharmacia biotech, Sweden)* تعیین شد [۲۹].

RNA استخراج شده در مرحله قبل، به روش رونویسی معکوس، توسط دستورالعمل کیت *(RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo fisher Scientific, US)* cDNA به DNA مکمل تبدیل شد [۲۹].

برای انجام مراحل Real Time -PCR از cDNA ساخته شده، پرایمر رفت و برگشت ژن‌های هدف و کنترل، کیت مسترمیکس سایبرگرین *(SYBR qPCR Mix, TOYOBO, Japan)* که حاوی آنزیم DNA پلیمراز و نمایان‌گر سایبرگرین بود، استفاده شد. سپس از طریق دستگاه Real-time PCR *(RG-6000, Corbett, Australia)*، با برنامه زمانی ویژه، تکثیر و مورد پایش قرار گرفت [۲۹].

پس از پایان واکنش Real Time -PCR، آستانه چرخه (Cycle threshold (Ct)) بدست آمد. Ct ژن‌های هدف هر نمونه از Ct ژن خانه گردان (HPRT) همان نمونه کسر شد (الف) . در مرحله بعد، ΔCt نمونه تیمار شده، از ΔCt نمونه کنترل کم شد (ب). در مرحله آخر، منفی عدد به دست آمده (-ΔΔct) را به نمای دو رسانده (ج) و به این ترتیب بیان نسبی ژن‌های هدف (در سطح mRNA) با معیار چند برابر (fold change) به‌دست آمد [۲۹].

الف ▸ $\Delta ct = Ct_{CKmt1,2} - Ct_{HPRT}$

ب ▸ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Intervention} - \Delta Ct_{Control}$

ج ▸ $2^{-\Delta\Delta Ct}$

از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ به منظور انجام عملیات آماری استفاده شد. نمودارها از طریق نرم افزار Adobe Illustrator نسخه ۲۰ ترسیم شدند. از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk).برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. تساوی واریانس گروه‌ها از طریق آزمون لون (Levene's Test) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور مقایسه وزن آزمودنی‌ها در گروه‌های مورد پژوهش از آزمون تحلیل واریانس چندگانه (MANOVA) استفاده شد. برای بررسی اثر غذای پرچرب، اثر تمرین ورزشی و اثر متقابل غذای پرچرب و تمرین ورزشی بر بیان ژن‌های CKmt1 و CKmt2 از تحلیل واریانس دو طرفه (Two Way ANOVA) استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گفته شد.

نتایج

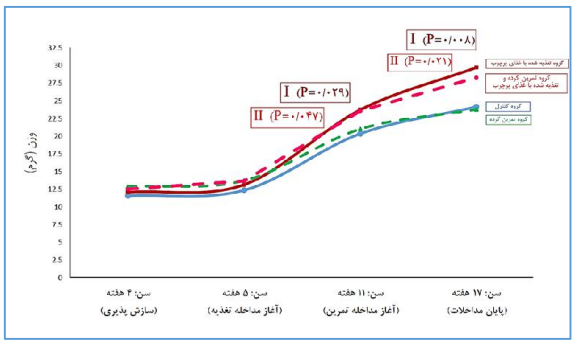
بر اساس آزمون شاپیرو-ویلک مشخص گردید که داده‌های مربوط به متغیر وزن (P=۰/۱۲۲) و داده‌های مربوط به متغیرهای CKmt1 (P=۰/۹۴۵) و CKmt2 (P=۰/۸۷۹) در گروه‌های مورد پژوهش، دارای توزیع نرمالی هستند. هم‌چنین، نتایج آزمون لِون نشان داد، متغیرهای وزن (۰/۸۹۳ =P)، CKmt1 (P=۰/۷۹۰) و CKmt2 (P=۰/۶۸۰) در گروه های مورد پژوهش دارای واریانس برابر هستند (P>۰/۱۲۲).

تغییرات وزن: تغییرات وزن گروه‌های مورد پژوهش در طول دوره زمانی در شکل ۱ ترسیم شده است. نتایج آزمون ویلک لامدا (Wilks Lamda) در تحلیل واریانس چندگانه نشان داد، تغییرات وزن گروه‌های مورد پژوهش معنی‌دار است (P=۰/۰۰۱). نتیجه آزمون اثرهای بین موردی (between- subjects effects) نشان داد که تفاوت مقدار

وزن گروه‌های مورد پژوهش در سن یازده هفته (P=۰/۰۱۲) و سن ۱۷ هفته (P=۰/۰۰۱) معنی‌دار بود.

بررسی جزئی‌تر (آزمون مقایسه زوجی pairwise comparisons test) نشان داد، ۱) در سن ۱۱ هفته، مقدار وزن گروه‌های تغذیه شده با غذای پرچرب (P=۰/۰۲۹) و هم‌چنین مقدار وزن گروه تمرین کرده- تغذیه شده با غذای پرچرب (P=۰/۰۴۷) در مقایسه با مقدار وزن گروه کنترل از نظر آماری بالاتر است ۲) در سن ۱۱ هفته، تفاوت مقدار وزن گروه تمرین کرده-تغذیه شده با غذای پرچرب در مقایسه با مقدار وزن گروه تغذیه شده با غذای پرچرب (P=۰/۹۱۰) و هم‌چنین در مقایسه با مقدار وزن گروه تمرین کرده (P=۰/۲۱) معنی‌دار نبود ۳) در سن ۱۷ هفته، مقدار وزن گروه‌های تغذیه شده با غذای پرچرب (۰/۰۰۸ =P) و مقدار وزن گروه تمرین‌کرده- تغذیه شده با غذای پرچرب (P=۰/۰۲۱) در مقایسه با مقدار وزن گروه کنترل از نظر آماری بالاتر بود. ۴) در سن ۱۷ هفته، مقدار وزن گروه تمرین کرده-تغذیه شده با غذای پرچرب در مقایسه با مقدار وزن گروه تغذیه شده با غذای پرچرب، تفاوت معنی‌دار نداشت (P=۰/۹۳۱) ولی در مقایسه با مقدار وزن گروه تمرین کرده بالاتر بود (P=۰/۰۰۱).

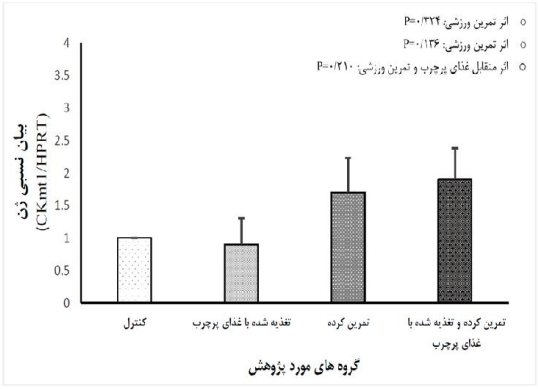
در مجموع، یافته‌های تغییرات وزن نشان می‌دهد، که بر اثر مصرف غذای پرچرب، وزن موش‌ها افزایش معنی‌داری یافت. با این حال، تمرین ورزشی کاهش معنی‌داری در وزن موش‌هایی که با غذای استاندارد و غذای پرچرب تغذیه شده بودند، ایجاد نکرد.



شکل ۱- تغییر وزن (گرم) گروه‌های مورد پژوهش بر اثر اعمال مداخله‌های تغذیه و تمرین

داده‌های نمودار به صورت میانگین ارائه شده‌اند. تعداد موش‌های هر گروه ۷ سر است. از آزمون تحلیل واریانس چندگانه (MANOVA) برای تحلیل آماری داده‌ها استفاده شده است. p بیان‌گر سطح معنی داری در اختلاف وزن گروه‌های تغذیه شده با غذای پرچرب با وزن گروه کنترل در سن ۱۱ و ۱۷ هفته است. حرف I مربوط به گروه تغذیه شده با غذای پرچرب و حرف II مربوط به گروه تمرین‌کرده- تغذیه شده با غذای پرچرب است.

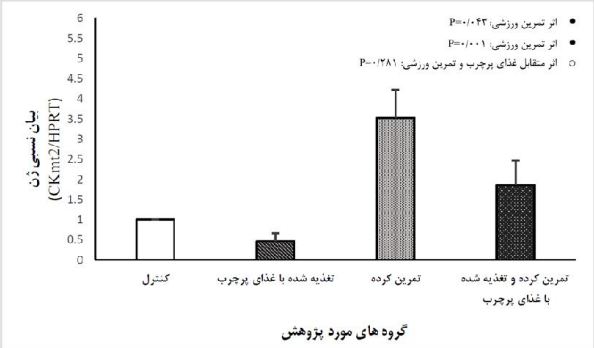
تغییرات بیان ژن CKmt1: بر اساس آزمون تحلیل واریانس دوطرفه، اثر غذای پرچرب (P=۰/۳۲۴) ، اثر تمرین ورزشی (P=۰/۱۳۶) و اثر متقابل غذای پرچرب و تمرین ورزشی (P=۰/۲۱۰) بر بیان ژن CKmt1 معنی‌دار نبود (شکل ۲).



شکل ۲- بیان ژنِ کراتین کیناز میتوکندری (ایزوفرم یک) (CKmt1) در گروه‌های مورد پژوهش

داده‌های بیان ژن بر اساس معیار چند برابر (Fold change) تعیین شده‌اند. داده‌های نمودار به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد موش‌های هر گروه ۷ سر است. آنالیز آماری از طریق آزمون تحلیل واریانس دو طرفه انجام شده است.

تغییرات بیان ژن CKmt2: بر اساس آزمون تحلیل واریانس دوطرفه، اثر غذای پرچرب (P=۰/۰۴۳) و اثر تمرین ورزشی (P=۰/۰۰۱) بر بیان ژن CKmt2 معنی‌دار بود. با این حال، اثر متقابل غذای پرچرب و تمرین ورزشی بر بیان این ژن معنی‌دار نبود (P=۰/۲۸۱) . (شکل ۳).



شکل ۳- بیان ژنِ کراتین کیناز میتوکندری (ایزوفرم دو) (CKmt2) در گروه‌های مورد پژوهش
داده‌های بیان ژن بر اساس معیار چند برابر (Fold change) تعیین شده‌اند. داده‌های نمودار به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد موش‌های هر گروه ۷ سَر است. آنالیز آماری از طریق آزمون تحلیل واریانس دو طرفه انجام شده است.

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد، بیان ژن CKmt1 بر اثر غذای پرچرب و تمرین ورزشی تغییر معنی‌دار نیافت. با این حال، بیان ژن CKmt2 بر اثر غذای پرچرب کاهش و بر اثر تمرین ورزشی افزایش یافت.

Kazak و همکاران گزارش کرده‌اند، با تقلیل ژنتیکی (Genetic Depletion) میزان کراتین کیناز میتوکندری، گرمازایی ناشی از تغذیه در ادیپوسایت‌های قهوه‌ای دچار اختلال شد [۱۹]. در بخش دیگری از این مطالعه، مشاهده شد پس از مصرف کوتاه مدت غذای پرچرب (چهار روز متوالی)، بیان کراتین کیناز میتوکندری افزایش می‌یابد [۱۹]. یافته‌های مطالعه فوق دلالت بر این دارند که کراتین کیناز میتوکندری در گرمازایی ناشی از تغذیه نقش دارد [۱۹]. بر همین اساس، انتظار می‌رفت، در این پژوهش، بیان ژن کراتین کیناز میتوکندری به دنبال مصرف غذای پرچرب افزایش یابد. اما بر خلاف انتظار، بیان ژن CKmt2 پس از ۱۲ هفته مصرف غذای پرچرب در بافت چربی سفید کاهش یافت (شکل ۳). دلیل کاهش بیان CKmt2 پس از مصرف طولانی مدت غذای پرچرب احتمالاً مربوط به کاهش کارایی مسیر پیام‌رسانی بتا آدرنرژیک (β-Adrenergic) است. بر این اساس که مسیر پیام رسانی گیرنده β3-Adrenergic ، اصلی‌ترین سازوکار در القاء گرمازایی و حفظ دمای بدن در بافت چربی است [۳۰] و در القاء رونویسی ژن CKmt2 نقش دارد [۳۱]. هم‌چنین مشخص شده است، بر اثر چاقی ناشی از غذای پرچرب، مسیر پیام‌رسانی گیرنده β-Adrenergic دچار اختلال می‌شود [۳۳-۳۲]. از این رو، گمان می‌رود بر اثر مصرف غذای پرچرب مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌ی β-Adrenergic در سلول‌های چربی دچار اختلال می‌شوند که بر اثر آن میزان بیان ژن CKmt2 در بافت چربی کاهش تنظیمی می‌یابد. دلیل دیگر در کاهش بیان CKmt2 ناشی از غذای پرچرب احتمالاً مربوط افزایش وزن و چاقی آزمودنی‌ها است. در این پژوهش، موش‌ها به مدت ۱۲ هفته غذای پرچرب مصرف کردند که با افزایش وزن معنی‌دار موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل که غذای معمول مصرف کرده بودند، همراه شد (شکل ۱) که دلالت بر چاقی (با درجه متوسط)

ناشی از غذای پرچرب دارد [۳۴]. مطالعات نشان داده‌اند، با افزایش طول مدت مصرف غذای پرچرب، کارایی مکانیسم-های مربوط به رونویسی ژن‌های گرمازا افت می‌کند [۳۵]. هم‌چنین، بر اثر مصرف غذای پرچرب، اندازه سلول‌ها و حجم بافت چربی افزایش می‌یابد که با تراوش ماکروفاژ به درون بافت چربی، ترشح ادیپوکائین‌های پیش التهابی و در نتیجه با التهاب موضعی همراه می‌شود [۳۷-۳۶]. التهاب موضعی نیز می‌تواند بیان ژن‌های مسئول گرمازایی را کاهش دهد [۳۸]. بنابراین، گمان می‌رود، کاهش تنظیمی بیان ژن CKmt2 ناشی از مصرف طولانی مدت غذای پرچرب که در این پژوهش مشاهده شد، مربوط به التهاب موضعی ناشی از تجمع چربی در بافت چربی است.

یافته‌ی نوین این پژوهش نشان داد؛ به دنبال شش هفته تمرین هوازی، بیان CKmt2 در بافت چربی سفید افزایش یافت (شکل۳). افزایش بیان CKmt2 ناشی از تمرین ورزشی، یافته ارزش‌مندی برای کمک به درمان چاقی محسوب می شود؛ چراکه این یافته این نظریه را حمایت می‌کند که تمرین ورزشی علاوه بر مصرف انرژی ناشی از فعالیت فیزیکی، از طریق تقویت گرمازایی غیرلرزشی موجب مصرف انرژی بیش‌تری می‌شود. بایستی در نظر داشت، پروتکل تمرینی تجویز شده در این پژوهش قادر به کاهش وزن معنی‌دار در موش‌های تغذیه شده با غذای معمول و غذای پرچرب نشد (شکل ۱) که احتمالاً مربوط به دوره نسبتاً کوتاه تمرین ورزشی است (شش هفته). این یافته حاکی از این است که افزایش تنظیمی در بیان ژن CKmt2 که بر اثر تمرین ورزشی حاصل می‌شود، ارتباطی با کاهش وزن یا کاهش میزان چاقی ندارد. بنابراین، احتمالاً مکانیسم‌های مستقل از تغییرات وزن در افزایش بیان CKmt2 ناشی از تمرین ورزشی دخالت داشته باشند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند، تحریک مزمن مسیر پیام رسانی β3 Adrenergic و هم‌چنین حذف ژنتیکی بتا آریستین (β-Arrestin) (خاموش کننده مسیر پیام‌رسانی بتا آدرنرژیک) باعث افزایش بیان CKmt2در بافت چربی سفید رانی می‌شود [۳۹، ۳۱]. از آنجاکه تمرین ورزشی موجب افزایش تنظیمی عوامل مسیر β-Adrenergic می‌شود [۴۲-۴۰]، تصور می‌شود، افزایش بیان CKmt2 ناشی از تمرین ورزشی مربوط به سازگاری در کارائی مسیر پیام‌رسانی β-Adrenergic→Adenylyl cyclase→ Protein Kinase A باشد. هم‌چنین، مطالعات نشان داده‌اند که برنامه اپی‌ژنتیک گرمازایی همچون CKmt2 و UCP1 توسط مکانیسم PGC1α/PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) coactivator 1-alpha (PGC1α) تنظیم می‌شود [۴۵-۴۳]. از سوی دیگر، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند؛ به دنبال انجام تمرینات ورزشی، بیان PGC1α و PPARy در بافت چربی سفید افزایش تنظیمی می‌یابد [۴۷-۴۶]. از این رو، احتمال دارد، افزایش بیان CKmt2 ناشی از تمرین ورزشی که در این پژوهش تجویز شده است، مربوط به میانجی‌گری عوامل PGC1α/PPARy باشد.

در این پژوهش تغییری در بیان ایزوفرم یک کراتین کیناز میتوکندری (CKmt1) مشاهده نشد. این یافته مطابق با یافته‌های مطالعات گذشته در مورد آزمودنی‌های حیوانی

است که نشان داده‌اند محرک‌های خارجی، بیان ایزوفرم یک (CKmt1) را کم‌تر تحت تأثیر قرار می‌دهند [۴۳، ۳۹، ۳۱]. این یافته بیان‌گر این مطلب است که نقش ایزوفرم دو (CKmt2) در قیاس با ایزوفرم یک (CKmt1) در فرآیند انتقال فسفات در میتوکندری‌های سلول‌های چربی در شرایط مصرف غذای پرچرب و انجام تمرین ورزشی بیش‌تر است.

در این پژوهش امکان اندازه گیری بیان ژن در سطح پروتئین وجود نداشت. هم‌چنین، عوامل تنظیمی مرتبط با CKmt اندازه گیری نشدند که به عنوان محدودیت پژوهش تلقی می‌شوند.

بر اساس نتایج این پژوهش، پیشنهاد می‌شود، مطالعات آینده، سازوکارهای درگیر در القاء بیان (در سطح رونویسی و ترجمه) ژن‌های کراتین کیناز میتوکندری ناشی از محرک-های تغذیه و تمرین ورزشی را مورد بررسی قرار دهند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که مصرف طولانی مدت غذای پرچرب (۱۲ هفته)، موجب کاهش تنظیمی بیان ایزوفرم دو کراتین کیناز میتوکندری (CKmt2) در بافت چربی می‌شود؛ درحالی‌که شش هفته تمرین ورزشی (هوازی) موجب افزایش تنظیمی بیان این ژن می‌شود. این یافته‌ها به صورت غیر مستقیم دلالت بر این دارند که مصرف طولانی مدت غذای پرچرب موجب تقلیل و انجام تمرین منظم هوازی موجب تقویت گرمازایی وابسته به کراتین کیناز (CKmt2) در بافت چربی سفید می‌شوند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته از طرح پژوهشی (۱۵۶۶۴-۱۳۷۲۹) با حمایت مالی دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره) انجام شده است. از این حیث، از مسئولین پژوهشی دانشگاه به جهت همکاری‌های صورت گرفته، کمال تشکر به عمل می‌آید. از سرکار خانم دکتر فاطمه جلالی به جهت همکاری در اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی و دکتر پویا امینی به جهت ارائه مشاوره‌های ارزشمند در مورد آنالیز آماری تشکر می‌شود.

References

[1] Engin A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome, in Obesity and lipotoxicity. *Obesity and Lipotoxicity* 2017; 1-17.

[2] Westerterp KR. Exercise, energy balance and body composition. *Eur J Clin Nutr* 2018; 72(9): 1246-50.

[3] Hansen TT, Andersen SV, Astrup A, Blundell J, Sjodin A. Is reducing appetite beneficial for body weight management in the context of overweight and obesity. *Obes Rev* 2019; 20(7): 983-97.

[4] Vargas-Castillo A, Fuentes-Romero R, Rodriguez-Lopez LA, Torres N, Tovar AR. Understanding the biology of thermogenic fat: is browning a new approach to the treatment of obesity? *Archives of medical research* 2017; 48(5): 401-13.

[5] Palmer B, Clegg D. Non-shivering thermogenesis as a mechanism to facilitate sustainable weight loss. *Obesity Reviews* 2017; 18(8): 819-31.

[6] Valente A, Jamurtas AZ, Koutedakis Y, Flouris AD. Molecular pathways linking non-shivering thermogenesis and obesity: focusing on brown adipose tissue development. *Biological Reviews* 2015; 90(1): 77-88.

[7] Lee P, Swarbrick MM, Ho KK. Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. *Endocrine Reviews* 2013; 34(3): 413-38.

[8] Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; 360(15): 1509-17.

[9] Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 2009; 58(7): 1526-31.

[10] Betz MJ, Enerbäck S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology* 2018; 14(2): 77-86.

[11] Challa TD, Dapito DH, Kulenkampff E, Kiehlmann E, Moser C, Straub L, et al. A Genetic Model to Study the Contribution of Brown and Brite Adipocytes to Metabolism. *Cell Reports* 2020; 30(10): 3424-33.

[12] Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17(2): 143-9.

[13] Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PloS one* 2012; 7(11): 1-12.

[14] Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, Hong H, Sonne SB, Kim M, et al. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nature medicine* 2015; 21(4): 389-97.

[15] Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2001; 1504(1): 82-106.

[16] Roesler A, Kazak L. UCP1-independent thermogenesis. *Biochemical Journal* 2020; 477(3): 709-25.

[17] Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological reviews* 2000; 80(3): 1107-213.

[18] Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, Erickson BK, Shinoda K, Cohen P, et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* 2015; 163(3): 643-55.

[19] Kazak L, Chouchani ET, Lu GZ, Jedrychowski MP, Bare CJ, Mina AI, et al. Genetic depletion of adipocyte creatine metabolism inhibits diet-induced thermogenesis and drives obesity. *Cell metabolism* 2017; 26(4): 660-71.

[20] Perna MK, Kokenge AN, Miles KN, Udobi KC, Clark JF, Pyne-Geithman GJ, et al. Creatine transporter deficiency leads to increased whole body and cellular metabolism. *Amino Acids* 2016; 48(8): 2057-65.

[21] Kazak L, Rahbani JF, Samborska B, Lu GZ, Jedrychowski MP, Lajoie M, et al. Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity. *Nature Metabolism* 2019; 1(3): 360-70.

[22] Bertholet AM, Kazak L, Chouchani ET, Bogaczyńska MG, Paranjpe I, Wainwright GL, et al. Mitochondrial patch clamp of beige adipocytes reveals UCP1-positive and UCP1-negative cells both exhibiting futile creatine cycling. *Cell Metabolism* 2017; 25(4): 811-22.

[23] Perez GS, Cordeiro GD, Santos LS, Espírito-Santo DD, Boaventura GT, Barreto-Medeiros JM. Does a high-fat diet-induced obesity model brown adipose tissue thermogenesis? A systematic review. *Archives of Medical Science* 2019; 15(1): 1-23.

[24] McKie GL, Wright DC. Biochemical adaptations in white adipose tissue following aerobic exercise: from mitochondrial biogenesis to browning. *Biochemical Journal* 2020; 477(6): 1061-81.

[25] Daneshyar S, Afshari S, Kadivar M, Foroutan Y. The effect of exercise training on the signaling pathway of Microrna196-A to uncoupling protein 1 in white adipose tissue. *Science & Sports* 2018; 33(6): 380-2.

[26] Benoit B, Plaisancie P, Awada M, Géloën A, Estienne M, Capel F, et al. High-fat diet action on adiposity,

inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. *Nutrition Research* 2013; 33(11): 952-60.

[27] Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Euro J CardioPrev & Rehab* 2007; 14(6): 753-60.

[28] Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR-alpha activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat and high-fructose-fed mice. *Nutrition* 2020; In Press.

[29] Lang S, Yang J, Yang K, Gu L, Cui X, Wei T, et al. Glucagon receptor antagonist upregulates circulating GLP-1 level by promoting intestinal L-cell proliferation and GLP-1 production in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care* 2020; 8(1): e001025-39.

[30] Bachman ES, Dhillon H, Zhang C-Y, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, et al. βAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 2002; 297(5582): 843-5.

[31] Pydi SP, Jain S, Tung W, Cui Y, Zhu L, Sakamoto W, et al. Adipocyte β-arrestin-2 is essential for maintaining whole body glucose and energy homeostasis. *Nature Communications* 2019; 10(1): 1-14.

[32] Collins S, Daniel K, Rohlfs E. Depressed expression of adipocyte β-adrenergic receptors is a common feature of congenital and diet-induced obesity in rodents. *International Journal of Obesity* 1999; 23(7): 669-77.

[33] Lowell BB, Bachman ES. Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* 2003; 278(32): 29385-8.

[34] Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews* 2010; 23(2): 270-99.

[35] Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, et al. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 2005; 4(3): 147-55.

[36] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology* 2011; 11(2): 85.

[37] Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nature metabolism* 2019; 1(2): 189-200.

[38] Martins FF, Bargut TCL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Thermogenesis, fatty acid synthesis with oxidation, and inflammation in the brown adipose

tissue of ob/ob (−/−) mice. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 2017; (210): 44-51.

[39] Wang L, Pydi SP, Cui Y, Zhu L, Meister J, Gavrilova O, et al. Selective activation of Gs signaling in adipocytes causes striking metabolic improvements in mice. *Molecular Metabolism* 2019; (27): 83-91.

[40] Snook LA, Trottier SK, Worndl EA, Bombardier E, Tupling AR, MacPherson REK. Prior Endurance Training Enhances Beta-Adrenergic Signaling in Epidydimal Adipose from Mice Fed a High-Fat Diet. *Obesity (Silver Spring)* 2017; 25(10): 1699-706.

[41] Ogasawara J, Izawa T, Sakurai T, Sakurai T, Shirato K, Ishibashi Y, et al. The Molecular Mechanism Underlying Continuous Exercise Training-Induced Adaptive Changes of Lipolysis in White Adipose Cells. *J Obes* 2015; Published online.

[42] Silva A, Zanesco A. Physical exercise, β-adrenergic receptors, and vascular response. *J Vasc Bras* 2010; 9(2): 47-56.

[43] Lee C-C, Shih Y-C, Kang M-L, Chang Y-C, Chuang L-M, Devaraj R, et al. Naa10p Inhibits Beige Adipocyte-Mediated Thermogenesis through N-α-acetylation of Pgc1α. *Molecular Cell* 2019; 76(3): 500-15.

[44] Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(10): 7153-64.

[45] Ringholm S, Grunnet Knudsen J, Leick L, Lundgaard A, Munk Nielsen M, Pilegaard H. PGC-1alpha is required for exercise- and exercise training-induced UCP1 up-regulation in mouse white adipose tissue. *PLoS One* 2013; 8(5): e64123-141.

[46] Ruschke K, Fishbein L, Dietrich A, Kloting N, Tonjes A, Oberbach A, et al. Gene expression of PPARgamma and PGC-1alpha in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. *Eur J Endocrinol* 2010; 162(3): 515-23.

[47] Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, Basaraba SA, Wright DC. Exercise and adrenaline increase PGC-1{alpha} mRNA expression in rat adipose tissue. *J Physiol* 2009; 587(Pt 7): 1607-17.

The Long-Term Effect of High Fat Diet and Regular Aerobic Exercise Training on Gene Expression of Isoforms of Mitochondrial Creatine Kinase (Ckmt1,2) in White Adipose Tissue of Mice: An Experimental Study

S. Daneshyar[1], A. Pouyandeh Ravan[2], A. Khosravi[3], Y. Foroutan[4]

Received: 22/04/2020 Sent for Revision: 16/06/2020 Received Revised Manuscript: 12/07/2020 Accepted: 19/07/2020

Background and Objectives: Mitochondrial creatine kinase involves in UCP-independent thermogenesis. It isthought that the agent can be affected by nutrition and exercise. The aim of this study was to investigate the long-term effect of high fat diet and regular aerobic exercise training on gene expression of mitochondrial creatine kinase 1 (CKmt1) and mitochondrial creatine kinase 2 (CKmt2) in white adipose tissue of mice.

Materials and Methods: In this experimental study, 28 male C57BL/6 mice were divide into four groups including control (n=7), high fat diet (HFD) (n=7), exercise training (ET) (n=7) and HFD-exercise training (HFD-ET) (n=7). The subjects of the HFD groups were fed a high-fat diet (fat: %40) for a period of 12 weeks. The subjects of the training groups underwent continuous training for six weeks. The Real Time–PCR method was used to measure the expression levels of the Ckmt1and Ckmt2 genes. The two-way ANOVA was applied to analyze data.

Results: Data showed that the HFD (p=0.324) and ET (p=0.136) did not significantly affect the gene expression level of CKmt1. However, the gene expression level of CKmt2 was significantly decreased and increased by HFD and ET versus high fat diet group, respectively (p=0.043; p=0.001, respectively).

Conclusion: The findings of this study indicated that the long term feeding of high fat diet and regular aerobic training could probably affect the non-shivering thermogenesis at white adipose tissue by decreasing and increasing the expression of mitochondrial creatine kinase 2 (CKmt2), respectively.

Key words: Obesity, High fat diet, Thermogenesis, White adipose tissue, C57BL/6 mice

Funding: This study was partly funded by Ayatollah Alozma Boroujerdi University as research project (15664-13729).

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of the Ayatollah Alozma Boroujerdi University has approved the study design (ABRU.AC.IR/15664-96.43).

How to cite this article: Daneshyar S, Pouyandeh Ravan A, Khosravi A, Foroutan Y. The Long-Term Effect of High Fat Diet and Regular Aerobic Exercise Training on Gene Expression of Isoforms of Mitochondrial Creatine Kinase (Ckmt1,2) in White Adipose Tissue of Mice: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 19 (6): 619-32. [Farsi]

1- Assistant Prof. of Exercise Physiology, Dept., of Physical Education, Faculty of Humanities, Ayatollah Alozma Boroujerdi University, Lorestan, Iran, ORCID: 0000-0002-8806-9736
(Corresponding Author) Tel: (066) 42468320, Fax: (066) 42468321, E-mail: s.daneshyar@abru.ac.ir
2- MSc in Clinical Biochemistry, Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran, ORCID: 0000-0001-8080-2596
3- Assistant Prof. of Exercise Physiology, Dept. of Physical Education, Faculty of Humanities, University of Ayatollah Alozma Boroujerdi, Lorestan, Iran, ORCID: 0000-0002-4728-8991
4- MSc in Exercise Physiology, Dept. of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University of Hamedan (Asadabad), Hamedan, Iran, ORCID: 0000-0003-1196-2830