

## اثر تمرین استقامتی و مصرف مکمل میلورم بر بیان ژن‌های MAPK و $\alpha$ Klotho و تغییرات بافت عضلانی اسکلتی در رت‌های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

امیر مونسان<sup>۱</sup>، علیرضا رحیمی<sup>۲</sup>، فریبا آقایی<sup>۳</sup>، امیر سرشین<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران  
پست الکترونیکی: [amir.mounesan@gmail.com](mailto:amir.mounesan@gmail.com)

۲- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۳- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۳۱

### چکیده

**سابقه و هدف:** کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یکی از شایع‌ترین اختلالات کبدی مرتبط با تجمع چربی در کبد بدون مصرف الکل است. تمرینات استقامتی و مکمل‌های غذایی، از جمله پروتئین‌های حشرات مانند میلورم (Mealworm)، ممکن است در بهبود NAFLD مؤثر باشند. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر تمرین استقامتی و مکمل میلورم بر بیان ژن‌های کینازهای فعال‌شونده با میتوزن (MAPK-Mitogen-Activated Protein Kinase) و  $\alpha$ کلوتو ( $\alpha$ Klotho) و تغییرات عضلانی در رت‌های مبتلا به NAFLD بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۱۵ سر رت نر نژاد ویستار ( $50 \pm 250$  گرم) به‌طور تصادفی به پنج گروه کنترل سالم، کبد چرب، کبد چرب + تمرین، کبد چرب + مکمل، و کبد چرب + تمرین + مکمل تقسیم شدند. القای NAFLD با رژیم پرچرب طی ۸ هفته انجام شد. تمرین استقامتی شامل دویدن روی تردمیل ۵ روز در هفته بود. مکمل میلورم با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، ۵ روز در هفته تجویز شد. بیان ژن‌های MAPK و  $\alpha$ Klotho با واکنش زنجیره‌ای پلیمریز در زمان واقعی (Real-Time Polymerase Chain Reaction) RT-PCR ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** تمرین استقامتی و مکمل میلورم به‌طور مستقل موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های MAPK و  $\alpha$ Klotho شدند ( $p < 0.001$ ). هر یک از این مداخلات موجب افزایش معنی‌دار تعداد و قطر تارهای عضلانی شدند ( $p < 0.001$ )، اما اثر ترکیبی آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p = 0.941$  و  $p = 0.688$ ). سطح آنزیم‌های SGPT و ALP کاهش معنی‌داری یافت ( $p < 0.001$ )، در حالی که سطح SGOT تغییر معنی‌داری نداشت.

**نتیجه‌گیری:** تمرین استقامتی و مکمل میلورم تأثیر مثبتی بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای سیگنالینگ سلولی و عملکرد کبد داشتند. با این حال، این ترکیب تأثیر قابل‌توجهی بر تغییرات ساختاری عضله اسکلتی نشان نداد. یافته‌های این پژوهش می‌توانند مبنایی برای تحقیقات آینده در درمان NAFLD باشند.

**واژگان کلیدی:** تمرین استقامتی، مکمل پروتئینی میلورم، مکمل غذایی، کبد چرب غیرالکلی، MAPK،  $\alpha$ Klotho

### پیام‌های اصلی

- تمرین استقامتی و مصرف مکمل پروتئینی میلورم موجب افزایش بیان ژن‌های MAPK و  $\alpha$ Klotho در عضله اسکلتی رت‌های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی شد.
- هر یک از این مداخلات به‌طور مستقل باعث بهبود شاخص‌های عملکرد کبد و کاهش آنزیم‌های کبدی گردید.
- تمرین استقامتی و مکمل میلورم تعداد و قطر تارهای عضلانی را افزایش دادند، اما اثر ترکیبی آن‌ها معنی‌دار نبود.
- این یافته‌ها نشان می‌دهد مداخلات غیر دارویی مبتنی بر ورزش و تغذیه می‌توانند در مدیریت NAFLD مؤثر باشند.

## ● مقدمه

کبد چرب غیرالکلی (NAFLD Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی در جهان است که با تجمع چربی در بافت کبد بدون مصرف الکل مشخص می‌شود. این بیماری می‌تواند به مراحل پیشرفته‌تری مانند استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH Non-Alcoholic Steatohepatitis)، فیبروز، سیروز و در نهایت سرطان کبد منجر شود (۱). شیوع بالای NAFLD با سبک زندگی ناسالم، چاقی، دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک ارتباط دارد. عدم تحرک بدنی و تغذیه نامناسب از عوامل کلیدی در توسعه و پیشرفت این بیماری محسوب می‌شوند. درمان‌های مرسوم برای NAFLD عمدتاً شامل تغییرات سبک زندگی، از جمله کاهش وزن و افزایش فعالیت بدنی هستند.

تحقیقات نشان داده‌اند که تمرینات بدنی می‌توانند بهبودهای معنی‌داری در پارامترهای متابولیکی و عملکرد کبد ایجاد کنند (۲). تحقیقات دیگر نیز نشان داده‌اند که ترکیب تمرینات استقامتی و مقاومتی می‌تواند به کاهش چربی کبد و بهبود عملکرد آنزیم‌های کبدی منجر شود (۳). تمرینات بدنی به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند: تمرینات مقاومتی و تمرینات استقامتی. تمرینات استقامتی به ویژه نقش مهمی در بهبود سلامت قلبی عروقی، کاهش وزن و بهبود حساسیت به انسولین دارند. از این رو، این نوع تمرینات به عنوان یکی از اصلی‌ترین روش‌های غیر دارویی برای مدیریت و درمان NAFLD توصیه می‌شوند.

تمرینات استقامتی شامل فعالیت‌هایی مانند دویدن، دوچرخه‌سواری و شنا هستند که باعث افزایش ضربان قلب و بهبود عملکرد قلب و ریه‌ها می‌شوند (۴). مطالعات نشان داده‌اند که این نوع تمرینات می‌تواند به کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و کاهش فشار خون کمک کند (۵). این تمرینات باعث افزایش مصرف اکسیژن و بهبود ظرفیت استقامتی می‌شوند که در نتیجه آن، متابولیسم بدن افزایش یافته و چربی‌های اضافی بدن به خصوص در ناحیه کبد کاهش می‌یابد. تحقیقات نشان داده‌اند که تمرینات استقامتی می‌توانند میزان چربی کبد را کاهش داده و عملکرد کبد را بهبود بخشند (۶). بررسی‌های متعددی نشان می‌دهد که این نوع تمرینات همچنین می‌توانند سطح التهابات سیستمیک و نشانگرهای استرس اکسیداتیو را کاهش دهند (۷).

علاوه بر ورزش، مکمل‌های غذایی نیز به‌عنوان گزینه‌های مکمل برای بهبود وضعیت بیماران مبتلا به NAFLD مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این میان، پروتئین‌های استخراج‌شده از حشرات مانند میلورم (Mealworm) به‌دلیل محتوای بالای پروتئین، اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌ها و مواد معدنی، توجه محققان را جلب کرده‌اند (۸). مطالعات اولیه نشان داده‌اند که مکمل میلورم می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود متابولیسم انرژی، به سلامت کبد و عضله کمک کند (۹).

از منظر مولکولی، مسیرهای سیگنالینگ سلولی مانند کینازهای فعال‌شونده با میتوزن (Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK) و پروتئین  $\alpha$ -کلتو (alpha-Klotho) نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهای مرتبط با التهاب، متابولیسم و استرس اکسیداتیو دارند. ژن‌های MAPK در رشد، بقا و پاسخ سلولی به تحریکات محیطی نقش دارند، در حالی که ژن  $\alpha$ Klotho به‌عنوان یک عامل ضد پیری با اثرات ضد التهابی و تنظیم‌کننده متابولیسم انرژی شناخته می‌شود. ژن MAPK یکی از کینازهای مهم در مسیرهای سیگنالینگ سلولی است که نقش کلیدی در تنظیم رشد، تقسیم و بقای سلول‌ها دارد (۱۰). تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت‌های تمرین ورزشی می‌توانند به تنظیم مثبت این ژن‌ها کمک کنند و در نتیجه منجر به بهبود فرآیندهای سلولی شوند (۱۱). از سوی دیگر، ژن  $\alpha$ Klotho به‌عنوان یک فاکتور طول عمر شناخته شده و نقش مهمی در تنظیم متابولیسم انرژی، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود عملکرد سلولی دارد (۱۲). بررسی تاثیر تمرینات بدنی و مکمل‌های غذایی بر بیان این ژن‌ها می‌تواند به درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی در بهبود وضعیت بیماران مبتلا به NAFLD کمک کند. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که  $\alpha$ Klotho می‌تواند نقش محافظتی در برابر استرس‌های متابولیکی و التهابی ایفا کند (۱۳).

در کنار این عوامل، عضلات اسکلتی نیز به‌عنوان یکی از بافت‌های مهم متابولیکی بدن، به تمرین بدنی و مکمل‌ها پاسخ می‌دهند. افزایش تعداد و قطر تارهای عضلانی، بهبود ظرفیت اکسیداسیون چربی‌ها و ارتقاء عملکرد متابولیکی عضلات از جمله پیامدهای مثبت تمرینات استقامتی هستند که می‌توانند به بهبود NAFLD کمک کنند (۱۴). تحقیقات نشان می‌دهد که این تغییرات می‌توانند بهبود متابولیسم گلوکز و لیپیدها را تسهیل کنند و به کاهش چربی‌های ذخیره شده در کبد کمک

معنی‌داری ۰,۰۵ تعیین شد (۱۷). با این حال، اندازه نمونه محدود به‌عنوان یکی از محدودیت‌های پژوهش در نظر گرفته شده و در بخش بحث نیز به آن اشاره شده است. برای القای کبد چرب، رت‌ها گروه‌های کبد چرب با رژیم غذایی پرچرب شامل ۱۵ درصد چربی حیوانی، ۴ درصد کلسترول، و ۱ درصد اسید کولیک به مدت ۸ هفته تغذیه شدند (۱۸). این رژیم از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد و به‌صورت آزاد در اختیار رت‌ها قرار گرفت.

پس از پایان دوره تغذیه و پیش از شروع مداخلات، نمونه‌های خونی از رت‌ها گرفته شد. سپس سطح آنزیم‌های کبدی SGPT (آلانین آمینوترانسفراز) و SGOT (آسپاراتات آمینوترانسفراز) با استفاده از کیت‌های تجاری (DiaSys، آلمان) و دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Biochrom WPA Lightwave II) اندازه‌گیری شدند (۱۹). RNA تام از عضله سولئوس با استفاده از کیت استخراج RNA (YTA، ایران) استخراج و خلوص آن با نانودراپ بررسی شد. سنتز cDNA با کیت YTA انجام گردید. واکنش Real-Time PCR با کیت SYBR Green (Takara، ژاپن) و دستگاه ABI StepOne Plus اجرا شد. شرایط PCR شامل دناتوراسیون اولیه (۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه) و ۴۰ چرخه شامل دناتوراسیون (۹۵°C، ۵ ثانیه) و اتصال/گسترش (۶۰°C، ۳۰ ثانیه) بود. تحلیل داده‌ها با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی انجام شد.

کنند (۱۵). این تغییرات می‌توانند نقش مهمی در بهبود وضعیت بیماران مبتلا به NAFLD داشته باشند، زیرا عضلات فعال می‌توانند به کاهش چربی‌های ذخیره شده در کبد و بهبود متابولیسم گلوکز و لیپیدها کمک کنند.

با توجه به اهمیت هم‌افزایی احتمالی میان تمرینات بدنی و مصرف مکمل‌های غذایی، هدف این مطالعه بررسی اثر ترکیبی تمرین استقامتی و مکمل پروتئینی میلورم بر بیان ژن‌های MAPK و  $\alpha$ Klotho و تغییرات عضله اسکلتی در رت‌های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی بود. نتایج این تحقیق می‌تواند در توسعه راهکارهای غیر دارویی برای مدیریت NAFLD نقش‌آفرین باشد.

### • مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی بود که بر روی ۱۵ سر رت نر نژاد ویستار، با میانگین وزنی  $250 \pm 50$  گرم و سن ۱۰ تا ۱۲ هفته، انجام شد. رت‌ها در شرایط استاندارد نگهداری شامل چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد، و رطوبت نسبی ۵۰ درصد قرار داشتند. رت‌ها به‌صورت تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند: گروه کنترل سالم ( $n=3$ )، گروه کبد چرب ( $n=3$ )، گروه کبد چرب+مکمل ( $n=3$ )، گروه کبد چرب+تمرین ( $n=3$ )، و گروه کبد چرب+مکمل+تمرین ( $n=3$ ) (۱۶).

تعداد رت‌ها در هر گروه ( $n=3$ ) بر اساس مطالعات پیشین مشابه و با هدف دستیابی به توان آماری ۸۰ درصد و سطح

جدول ۱. تمرین ورزشی تردمیل ۸ هفته ۵ روز در هفته

#### هفته اول

سرد کردن	استراحت فعال	تمرین	گرم کردن	
۵	۵	۱۰	۵	meter/min شدت
۵	۲	۱	۵	Min زمان
۱	۱۰	۱۰	۱	No. ست

#### هفته دوم

سرد کردن	استراحت فعال	تمرین	گرم کردن	
۵	۵	۱۲	۵	meter/min شدت
۵	۲	۱	۵	Min زمان
۱	۱۰	۱۰	۱	No. ست

#### هفته سوم

سرد کردن	استراحت فعال	تمرین	گرم کردن	
۵	۵	۱۴	۵	meter/min شدت
۵	۲	۱	۵	Min زمان
۱	۱۰	۱۰	۱	No. ست

## هفته چهارم تا هفته هشتم

سرد کردن	استراحت فعال	تمرین	گرم کردن	
۵	۵	۱۶	۵	meter/min شدت
۵	۲	۱	۵	Min زمان
۱	۱۰	۱۰	۱	No ست

نعلی (سولئوس) جدا شده و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. بیان ژن‌های MAPK و  $\alpha$ Klotho با استفاده از روش Real-Time PCR (کیت Takara, ژاپن) و دستگاه ABI StepOne Plus اندازه‌گیری شد.

شاخص‌های TOS و TAC با کیت‌های تجاری (Rel Assay Diagnostics, ترکیه) و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شدند (۲۲، ۲۳). در این تحقیق با استفاده از نرم افزار spss نسخه ۲۲ و از روش‌های آمار توصیفی جهت بررسی و توصیف ویژگی‌های داده‌ها و از آمار استنباطی جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده گردید. کلیه داده‌ها برای تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از روش آزمون کلموگراف-اسمیرنوف تحلیل شد و در صورت عدم تأیید توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس دو عاملی و آزمون t مستقل برای بررسی تغییرات بین گروه‌ها و بررسی تغییرات درون گروهی استفاده گردید. کد اخلاقی این پژوهش IR.IAU.K.REC.1403.066 برگرفته از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج بود.

پروتکل تمرین استقامتی به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته روی تردمیل اجرا شد. هر جلسه شامل سه مرحله گرم کردن (۵ دقیقه با شدت ۵ متر در دقیقه)، فعالیت اصلی (۲۰ دقیقه با شدت متوسط معادل ۱۲-۱۶ متر در دقیقه و زاویه شیب صفر درجه)، و سرد کردن (۵ دقیقه با شدت ۵ متر در دقیقه) بود. این پروتکل بر اساس مطالعات پیشین طراحی و اجرا شده است (۲۰).

رت‌ها گروه مکمل و گروه تمرین + مکمل، مکمل پروتئینی میلورم را به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته به صورت گاوژ با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. مکمل میلورم از یک منبع معتبر (شرکت Entomo Farms, کانادا) تهیه شد (۲۱).

رنگ‌آمیزی H&E و تری کروم برای بررسی ساختارهای بافتی و تمایز اجزای مختلف سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از پایان مداخلات، رت‌ها با استفاده از CO2 بیهوش شده و نمونه‌های خونی از قلب آن‌ها گرفته شد. بافت‌های کبد و عضله

جدول ۲. توالی آغازگرهای استفاده‌شده در واکنش Real-Time PCR

اندازه محصول (جفت‌باز)	توالی آغازگر (۵'→۳')	ژن مورد بررسی
۱۵۸	F: CAGATCCAGCTTGAGGATGC R: GCTGCTTCTTGTGGGTGAT	MAPK1 (ERK2)
۱۷۲	F: TGTGAAGGCTGAGGTGGATA R: AGACAGGCCAAAGAGACAGC	$\alpha$ Klotho
۱۶۰	F: AAGGCCATGCCAGTGAGCTTCCCG R: GGCGTGTGTAGCGGTTGAGGTCA	GAPDH

## • یافته‌ها

سطح آنزیم‌های کبدی SGPT و SGOT به‌طور معنی‌داری در گروه کبد چرب نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافت ( $p < 0/001$ ). این داده‌ها تأیید می‌کنند که مدل القایی کبد چرب به‌درستی اجرا شده است. مداخلات تمرین استقامتی و مکمل میلورم باعث کاهش معنی‌دار این آنزیم‌ها نسبت به گروه کبد چرب شدند ( $p = 0/003$  و  $p = 0/005$ ). ترکیب این دو مداخله کاهش بیشتری در سطوح SGPT و SGOT نشان داد و به‌طور معنی‌داری نسبت به هر دو مداخله به‌تنهایی بهتر عمل کرد ( $p < 0/01$ ). سطح ALP نیز در گروه مدل نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ( $p = 0/001$ ) و با هر دو مداخله به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. (تصاویر ۱ تا ۳)

میانگین وزن رت‌ها در گروه تمرین و تمرین + مداخله کاهش اندکی نسبت به گروه کنترل نشان داد، اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. کاهش وزن احتمالی ممکن است ناشی از افزایش مصرف انرژی در طی تمرینات استقامتی باشد. جدول ۴، میانگین و انحراف معیار آنزیم‌های کبدی، بیان ژن‌ها، و ویژگی‌های عضله اسکلتی را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. مقادیر به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده‌اند. تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها در متن تشریح شده‌اند.

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار وزن رت‌ها (گرم) قبل و بعد از مداخله تمرینی در گروه‌های مختلف

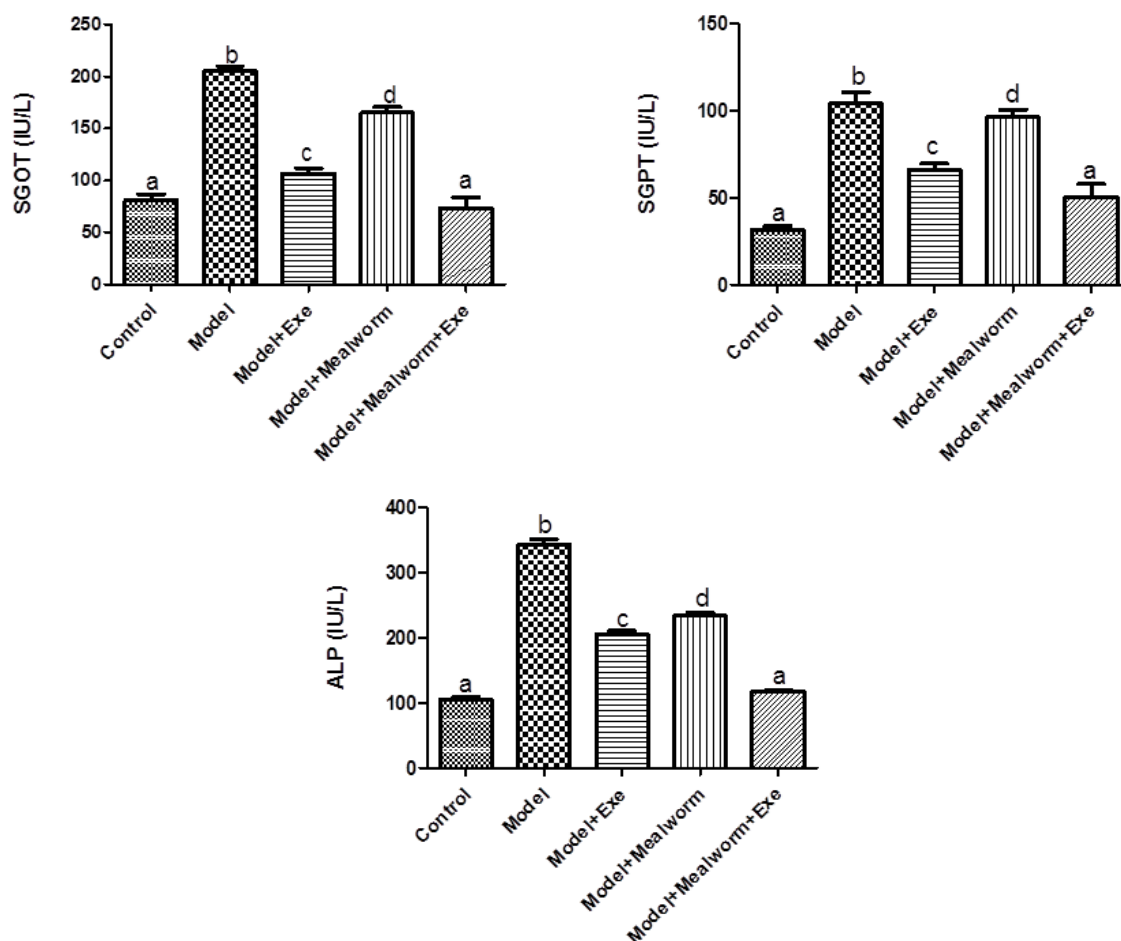
گروه	وزن قبل از تمرین (g)	وزن بعد از تمرین (g)	تغییر وزن
کنترل	۲۶۰.۴ ± ۱۱.۲	۲۶۳.۷ ± ۱۰.۸	+۳.۳
تمرین	۲۶۱.۹ ± ۹.۸	۲۵۰.۲ ± ۸.۵	-۱۱.۷
تمرین + مداخله	۲۶۲.۷ ± ۱۰.۴	۲۴۶.۱ ± ۹.۱	-۱۶.۶

جدول ۴. میانگین ± انحراف معیار متغیرهای اصلی در گروه‌های مختلف

متغیر	کنترل سالم	مدل (NAFLD)	مدل+تمرین	مدل+مکمل	مدل+تمرین+مکمل
SGPT (IU/L)	۴۲.۱ ± ۴.۵	۷۹.۴ ± ۶.۸	۵۶.۲ ± ۵.۲	۵۸.۵ ± ۵.۷	۴۸.۹ ± ۴.۶
SGOT (IU/L)	۳۶.۷ ± ۳.۲	۷۰.۸ ± ۶.۱	۵۲.۳ ± ۴.۹	۵۴.۱ ± ۵.۱	۴۵.۷ ± ۴.۱
ALP (IU/L)	۱۱۰.۲ ± ۱۰.۳	۱۸۹.۵ ± ۱۲.۷	۱۳۸.۶ ± ۱۱.۴	۱۴۰.۳ ± ۹.۹	۱۲۵.۱ ± ۸.۸
MAPK بیان ژن ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	۱.۰۰ ± ۰.۰۰	۰.۳۶ ± ۰.۰۴	۱.۴۷ ± ۰.۰۹	۱.۴۲ ± ۰.۰۸	۷.۲۵ ± ۰.۴۶
$\alpha$ Klotho بیان ژن ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	۱.۰۰ ± ۰.۰۰	۰.۴۱ ± ۰.۰۳	۱.۵۱ ± ۰.۰۷	۱.۴۵ ± ۰.۰۶	۱.۵۳ ± ۰.۰۹
تعداد تار عضلانی (در mm <sup>2</sup> )	۱۴۲ ± ۱۰	۹۸ ± ۹	۱۳۰ ± ۸	۱۲۷ ± ۹	۱۳۲ ± ۷
قطر تار عضلانی ( $\mu$ m)	۱۵۰.۴ ± ۵.۱	۱۲۲.۷ ± ۶.۴	۱۴۳.۲ ± ۴.۷	۱۴۰.۵ ± ۵.۲	۱۴۶.۷ ± ۳.۹

جدول ۴، میانگین و انحراف معیار آنزیم‌های کبدی، بیان ژن‌ها، و ویژگی‌های عضله اسکلتی را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها در متن تشریح شده‌اند.

سطح آنزیم‌های کبدی SGPT و SGOT به‌طور معنی‌داری در گروه کبد چرب نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافت ( $p < 0/001$ ). این داده‌ها تأیید می‌کنند که مدل القایی کبد چرب به‌درستی اجرا شده است. مداخلات تمرین استقامتی و مکمل میلورم باعث کاهش معنی‌دار این آنزیم‌ها نسبت به گروه کبد چرب شدند ( $p = 0/003$  و  $p = 0/005$ ). سطح ALP نیز در گروه مدل نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ( $p = 0/001$ ) و با هر دو مداخله به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. (تصاویر ۱ تا ۳)



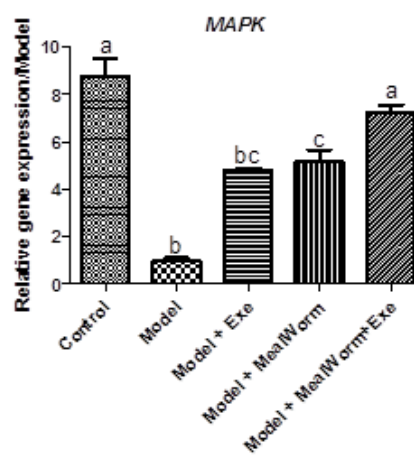
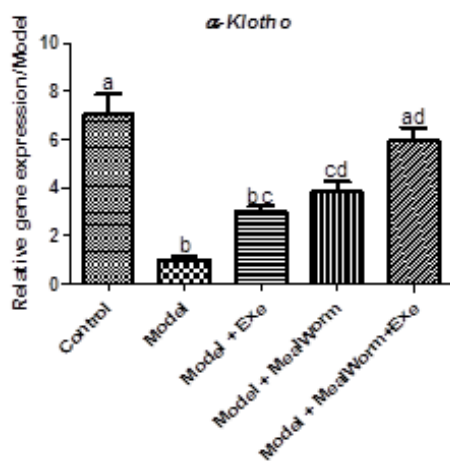
تصاویر ۱ تا ۳. مقایسه SGPT و SGOT و ALP در گروه‌های مختلف

تحت تأثیر تمرین استقامتی و مکمل پروتئینی میلورم قرار گرفت. تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن

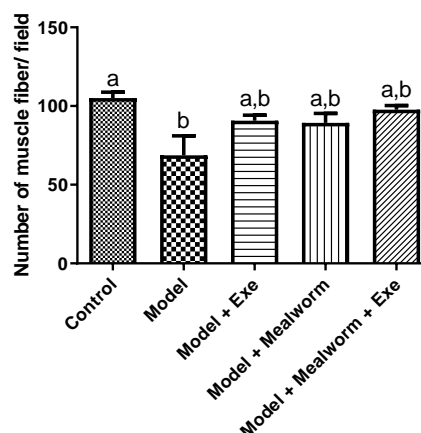
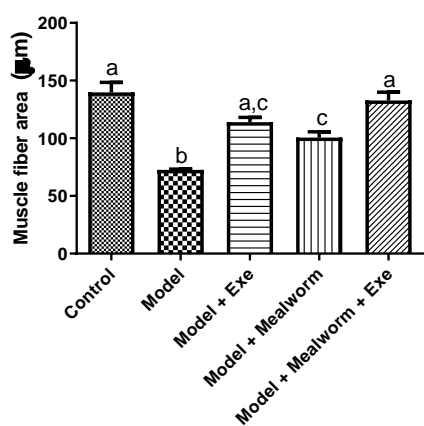
بر اساس یافته‌ها، بیان ژن‌های MAPK و ALPHA-KLOTHO در بافت عضله اسکلتی رت‌های مبتلا به کبد چرب

در ( $p < 0/001$ ) و قطر تارهای عضله اسکلتی ( $p < 0/001$ ) در رت‌های مبتلا به کبد چرب شدند. باین‌حال، اثر تعاملی بین این دو مداخله بر تعداد ( $p = 0/941$ ) و قطر تارهای عضلانی ( $p = 0/688$ ) معنی‌دار نبود، به این معنا که ترکیب آن‌ها تأثیر بیشتری نسبت به هر کدام به‌تنهایی نداشت (تصاویر ۷ و ۸). تصاویر زیر مقطع عرضی بافت عضله رت را نشان می‌دهد که با رنگ هماتوکسلین و اتوزین رنگ آمیزی شده است. در تصاویر میکروسکوپی عرضی عضله سولئوس، گروه مدل نسبت به گروه کنترل کاهش قطر فیبرها، افزایش بافت همبند، و اختلال در انسجام عضلانی را نشان داد. گروه‌های تمرین و مکمل به‌طور جداگانه بهبود نسبی نشان دادند و گروه ترکیبی (تمرین + مکمل) افزایش معنی‌داری در قطر فیبرها نسبت به گروه مکمل داشت (تصاویر ۹ و ۱۰).

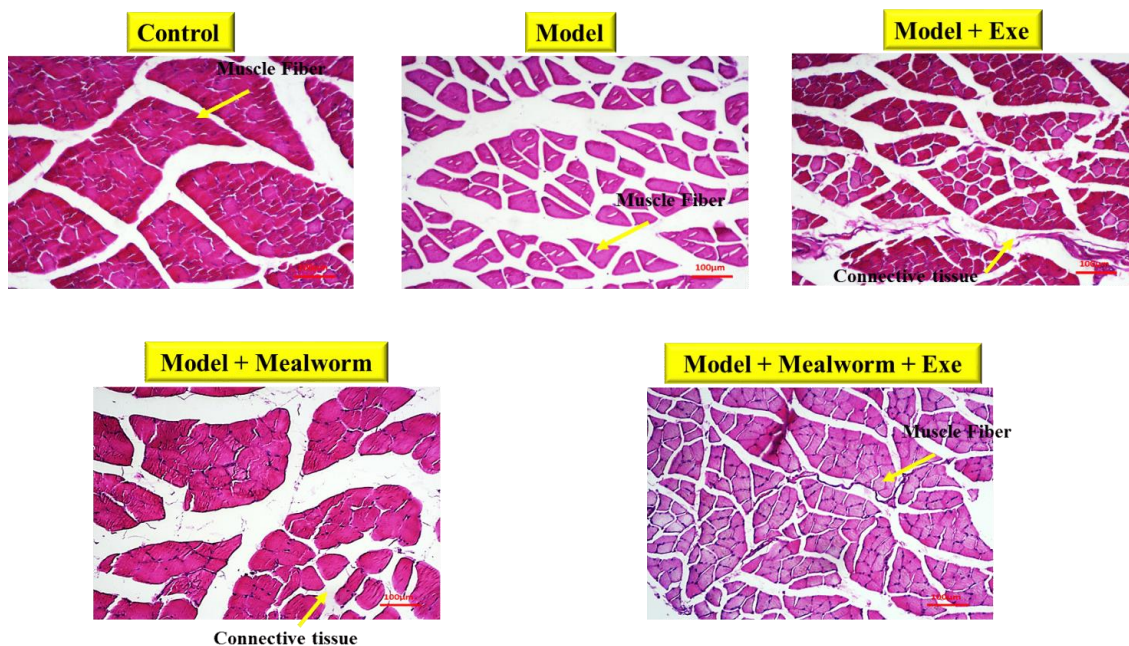
MAPK ( $p < 0/001$ ) و ALPHA-KLOTHO ( $p < 0/001$ ) شد. همچنین، مصرف مکمل پروتئینی میلورم به‌طور مستقل باعث افزایش معنی‌دار بیان هر دو ژن MAPK ( $p < 0/001$ ) و ALPHA-KLOTHO ( $p < 0/001$ ) گردید. اثر تعاملی بین تمرین استقامتی و مکمل میلورم بر بیان ژن MAPK معنی‌دار بود و ترکیب این دو مداخله نسبت به هر کدام به‌تنهایی تأثیر بیشتری بر افزایش بیان این ژن داشت ( $p < 0/001$ ). باین‌حال، اثر تعاملی تمرین و مکمل بر بیان ژن ALPHA-KLOTHO معنی‌دار نبود ( $p = 0/836$ )، به این معنی که ترکیب این دو عامل تأثیر ویژه‌ای نسبت به هر کدام به‌تنهایی نداشت. (تصاویر ۶ و ۷) بر اساس یافته‌ها، تمرین استقامتی و مصرف مکمل پروتئینی میلورم به‌طور مستقل باعث افزایش معنی‌دار تعداد



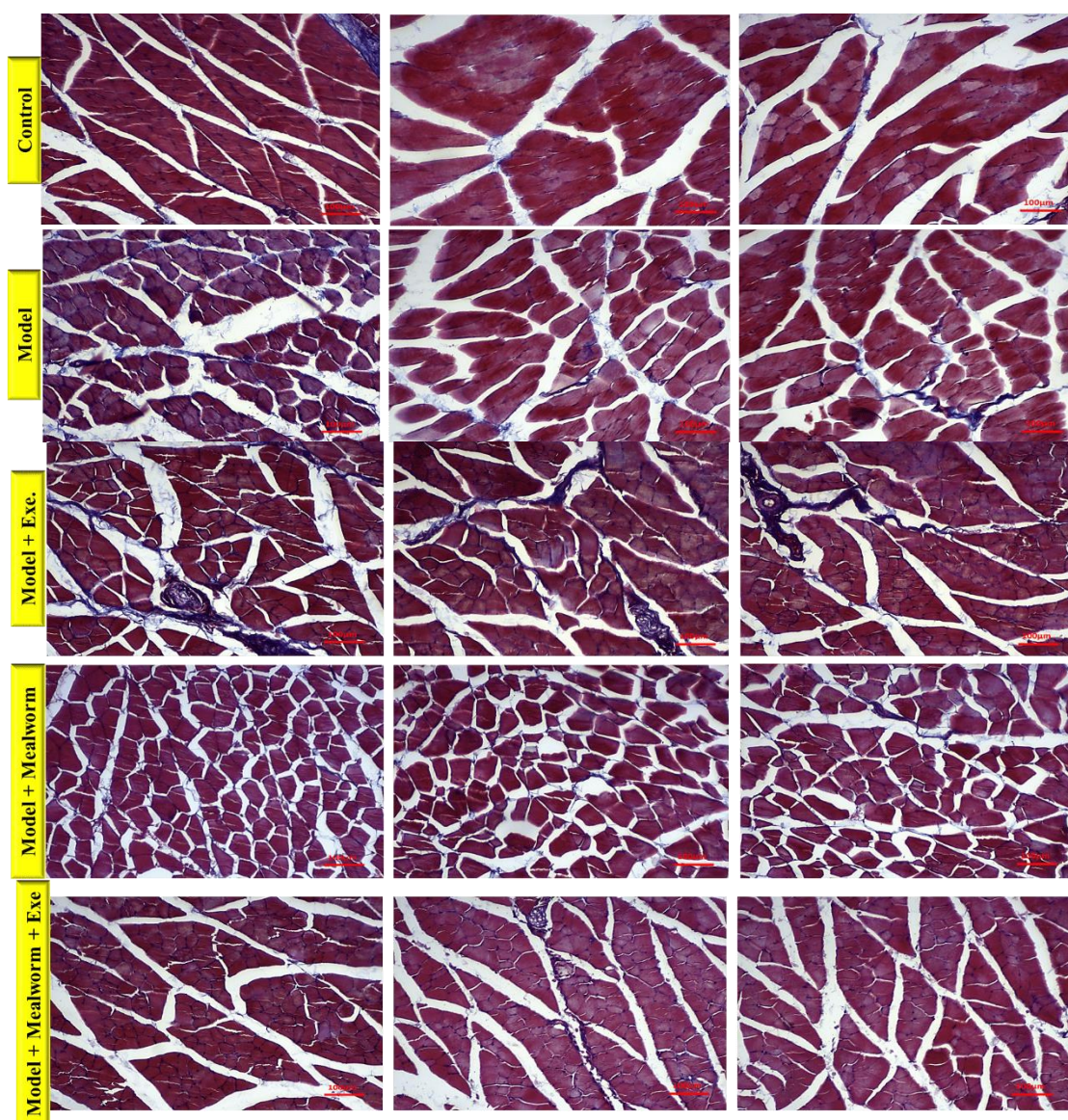
تصاویر ۶ و ۷. مقایسه MAPK و ALPHA-KLOTHO در گروه‌های مختلف



تصاویر ۷ و ۸. مقایسه تعداد تارهای عضله اسکلتی و قطر تارهای عضله اسکلتی در گروه‌های مختلف



تصویر ۹. تصاویر مقطع عرضی بافت عضله اسکلتی با رنگ آمیزی اتوزین و هماتوکسلین



تصویر ۱۰. تصاویر مقطع عرضی بافت عضله اسکلتی با رنگ آمیزی تریکروم ماسون

## • بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب تمرینات استقامتی و مصرف مکمل پروتئینی میلورم تاثیرات مثبتی بر بیان ژن‌های MAPK و  $\alpha$ Klotho در بافت عضله اسکلتی رت‌های مبتلا به کبد چرب دارد. همچنین، تغییرات قابل توجهی در برخی از پارامترهای عملکردی کبد مشاهده شد، اما تغییرات ساختاری در عضله اسکلتی تحت تاثیر این مداخلات قرار نگرفت. در این بخش، به بررسی و تحلیل این نتایج با استناد به مطالعات قبلی و مکانیسم‌های زیستی مربوطه پرداخته می‌شود.

بیان ژن MAPK نقش مهمی در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی، از جمله رشد، تقسیم و بقای سلول‌ها دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب تمرین استقامتی و مکمل پروتئینی میلورم باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن MAPK در بافت عضله اسکلتی شد. افزایش بیان این ژن می‌تواند به فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن (MAPK) منجر شود که در تقویت و نگهداری بافت‌های عضلانی و بازسازی آن‌ها پس از آسیب نقش اساسی دارد. در مطالعاتی گزارش شده است که تمرینات بدنی موجب افزایش فعالیت کینازهای فعال‌شونده با میتوزن (MAPKs) می‌شوند (۲۴). این افزایش می‌تواند به بهبود فرآیندهای ترمیم و بازسازی عضلانی، افزایش تحمل به فشارهای فیزیولوژیکی و بهبود عملکرد متابولیکی کمک کند. علاوه بر این، فعال‌سازی مسیر MAPK می‌تواند به تقویت مقاومت عضلات در برابر استرس اکسیداتیو و کاهش تخریب سلولی کمک کند، که به نوبه خود به حفظ سلامت و عملکرد عضلات در شرایط بیماری کمک می‌کند. مطالعاتی نیز نشان داده‌اند که تمرینات مقاومتی می‌توانند فعالیت MAPK را در عضلات افزایش داده و از تخریب عضلانی جلوگیری کنند (۲۵).

همچنین، ژن  $\alpha$ Klotho به عنوان یک فاکتور طول عمر شناخته شده و نقش مهمی در تنظیم متابولیسم انرژی و کاهش استرس اکسیداتیو دارد. افزایش بیان ژن  $\alpha$ Klotho در بافت عضله اسکلتی تحت تاثیر تمرین استقامتی و مکمل پروتئینی میلورم نشان‌دهنده پتانسیل این مداخلات در بهبود وضعیت متابولیکی و کاهش استرس اکسیداتیو است (۲۶). این افزایش ممکن است به تقویت عملکرد میتوکندری‌ها و افزایش تولید ATP در عضلات منجر شود، که نه تنها انرژی لازم برای انقباض عضلات را فراهم می‌کند بلکه از خستگی زودرس نیز جلوگیری می‌کند. این افزایش می‌تواند به تقویت عملکرد میتوکندری‌ها و افزایش تولید انرژی در عضلات کمک کند، که در نهایت منجر

به بهبود عملکرد عضلات و کاهش خستگی می‌شود. این یافته می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم در بهبود عملکرد عضلات و کبد در بیماران مبتلا به NAFLD مورد توجه قرار گیرد. مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن  $\alpha$ Klotho می‌تواند به بهبود عملکرد قلبی و کلیوی کمک کند (۲۷).

این مطالعه نشان داد که تمرینات استقامتی به همراه مکمل پروتئینی میلورم باعث کاهش معنی‌دار در میزان آنزیم‌های SGPT و ALP در بافت کبد رت‌های مبتلا به کبد چرب شد. این نتایج با مطالعات قبلی همخوانی دارد که نشان می‌دهد تمرینات بدنی می‌توانند به بهبود عملکرد کبد و کاهش آنزیم‌های کبدی مرتبط با آسیب‌های کبدی کمک کنند (۲۸). کاهش این آنزیم‌ها نشان‌دهنده کاهش آسیب‌های اکسیداتیو و التهابی در کبد است، که می‌تواند به عنوان یک شاخص مهم در جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های کبدی، به ویژه در مراحل اولیه، تلقی شود. مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که تمرینات استقامتی می‌توانند به کاهش آنزیم‌های کبدی و بهبود پروفایل لیپیدی کمک کنند (۲۹). کاهش آنزیم (ALT) SGPT به عنوان یک نشانگر مهم در تشخیص آسیب‌های کبدی نشان‌دهنده بهبود وضعیت کبدی تحت تاثیر این مداخلات است. همچنین، کاهش آنزیم ALP می‌تواند نشان‌دهنده بهبود در عملکرد سلول‌های کبدی و کاهش التهابات کبدی باشد. علاوه بر این، کاهش این آنزیم‌ها ممکن است با کاهش تجمع چربی در کبد و بهبود پروفایل لیپیدی مرتبط باشد، که نشان‌دهنده اثرات مثبت این مداخلات بر بهبود سلامت عمومی کبد است. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که کاهش سطح این آنزیم‌ها می‌تواند نشان‌دهنده بهبود وضعیت التهابی کبد باشد (۳۰).

با این حال، نتایج نشان داد که تمرینات استقامتی به همراه مکمل پروتئینی میلورم تاثیر معنی‌داری بر میزان آنزیم SGOT (AST) در بافت کبد نداشت. این ممکن است به دلیل تفاوت‌های فردی در پاسخ به تمرینات بدنی و مکمل‌ها باشد یا ممکن است نشان‌دهنده نیاز به دوره‌های طولانی‌تر یا شدت‌های بالاتر تمرینات باشد تا تاثیرات کامل‌تری بر تمامی آنزیم‌های کبدی مشاهده شود. این نتیجه نیازمند تحقیقات بیشتری است تا مکانیسم‌های دقیق‌تر و شرایط بهینه برای بهبود عملکرد کبد در بیماران مبتلا به NAFLD مشخص شود.

یکی دیگر از یافته‌های این مطالعه این بود که ترکیب تمرین استقامتی و مکمل پروتئینی میلورم تاثیر معنی‌داری بر تعداد و قطر تارهای عضله اسکلتی رت‌های مبتلا به کبد چرب نداشت. این نتیجه ممکن است نشان‌دهنده این باشد که مدت زمان و

است. بر این اساس، استفاده از یک رژیم مکملی جامع تر و متنوع تر می تواند به بهبود نتایج این گونه مطالعات و افزایش اثرات مثبت بر رشد عضلانی منجر شود.

### نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که ترکیب تمرین استقامتی و مکمل پروتئینی میلووم می تواند به عنوان یک استراتژی موثر در بهبود بیان ژن های مرتبط با مسیرهای سیگنالینگ سلولی و بهبود عملکرد کبد در بیماران مبتلا به NAFLD مورد توجه قرار گیرد. این مطالعه نشان داد که تمرین استقامتی و مصرف مکمل پروتئینی میلووم می تواند بهبودهای قابل توجهی در پارامترهای متابولیکی کبد و بیان ژن های کلیدی در عضله اسکلتی ایجاد کند. با این حال، تاثیر این ترکیب بر تعداد و قطر تارهای عضلانی مشاهده نشد. این نتایج می تواند به عنوان مبنایی برای تحقیقات آینده در زمینه استفاده از مکمل های غذایی و تمرینات بدنی در درمان NAFLD مورد استفاده قرار گیرد و نشان دهنده نیاز به برنامه های تمرینی و تغذیه ای جامع تر و دقیق تر برای بهبود کامل وضعیت بیماران مبتلا به این بیماری است.

### منشور اخلاقی

کد اخلاقی این پژوهش IR.IAU.K.REC.1403.066 برگرفته از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج بود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری آقای امیر مونسان با عنوان "تاثیر یک دوره تمرین استقامتی به همراه مکمل پروتئینی میلووم بر Cross-Talk کبدی-عضلانی در عضله اسکلتی و تغییرات عضله در رت های مدل کبد چرب" در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج می باشد. از خانم دکتر مظاهری، رئیس آزمایشگاه تحقیقاتی بافت و ژن هیستونوتک، بابت حمایت ها و راهنمایی های بی دریغشان، و همچنین از خانم دکتر نورزاد، گروه فیزیولوژی تمرین ورزشی دانشگاه شهید رجایی تهران، به خاطر کمک ها و همفکری های ارزشمندشان در طول مراحل تحقیق، نهایت سپاس و قدردانی را دارم.

**تضاد منافع:** هیچ تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

شدت تمرینات مورد استفاده در این مطالعه برای ایجاد تغییرات ساختاری در عضله کافی نبوده است. علاوه بر این، عدم مشاهده تغییرات ممکن است به دلیل استفاده از نوع خاصی از مکمل پروتئینی باشد که ممکن است در مقایسه با مکمل های پروتئینی با کیفیت بالاتر، اثربخشی کمتری در افزایش توده عضلانی داشته باشد. مطالعات قبلی نشان داده اند که تمرینات بدنی طولانی مدت و با شدت بالا می توانند منجر به هیپرتروفی عضلانی و افزایش تعداد تارهای عضلانی شوند (۳۱). بررسی ها نشان می دهند که علاوه بر شدت و مدت تمرین، نوع و مقدار پروتئین مصرفی نیز نقش حیاتی در تحریک رشد عضلانی ایفا می کند، و انتخاب مکمل های با کیفیت تر و یا ترکیب آن ها با دیگر عوامل تقویت کننده ممکن است منجر به نتایج بهتر شود. این امر ممکن است نشان دهنده نیاز به برنامه های تمرینی با شدت و حجم بیشتر و یا استفاده از مکمل های پروتئینی با ترکیبات و دوزهای قوی تر برای تحریک بهینه رشد عضلانی باشد. مطالعات دیگر نیز نشان داده اند که تمرینات با شدت بالا و مصرف مکمل های پروتئینی می توانند به افزایش توده عضلانی کمک کنند (۳۲). از این رو، برای مشاهده تغییرات ساختاری در عضله، ممکن است نیاز به برنامه های تمرینی طولانی تر و شدیدتر باشد.

علاوه بر این، نوع مکمل پروتئینی مورد استفاده نیز می تواند نقش مهمی در نتایج داشته باشد. پروتئین میلووم دارای ترکیبات مغذی متنوعی است، اما ممکن است برای ایجاد تغییرات ساختاری قابل توجه در عضلات، نیاز به مصرف مکمل های پروتئینی با ترکیبات و دوزهای متفاوت باشد. به طور خاص، ترکیبات اسید آمینه ای موجود در مکمل می تواند تاثیر مستقیم بر سنتز پروتئین عضلانی و تنظیم متابولیسم پروتئین داشته باشد، و در این مطالعه ممکن است دوز و نوع اسید آمینه بهینه نبوده باشد. مطالعات نشان داده اند که مکمل های پروتئینی با دوزهای بالاتر می توانند به طور مؤثرتری به هیپرتروفی عضلانی کمک کنند (۳۳). همچنین، ترکیب مکمل پروتئینی با دیگر مکمل های غذایی مانند آمینواسیدهای شاخه دار (BCAAs) یا کراتین می تواند تاثیرات مثبتی بر هیپرتروفی عضلانی داشته باشد که در این مطالعه بررسی نشده

### References

- Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Role of AMPK 3. 2016.
- Niriella MA, Dassanayake U, de Silva HJJSJoG. Mistakes in managing non-alcoholic fatty liver disease and how to avoid them. 2023;58(3):223-6.

- Powell EE, Wong VW-S, Rinella MJTL. Non-alcoholic fatty liver disease. 2021;397(10290):2212-24.
- Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen-Schimke JM, et al. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. 2003;52(8):1888-96.

5. Brunt EM, Wong VW-S, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. 2015;1(1):1-22.
6. Stevanović J, Beleza J, Coxito P, Ascensão A, Magalhães JJM. Physical exercise and liver "fitness": Role of mitochondrial function and epigenetics-related mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease. 2020;32:1-14.
7. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. 2000;132(2):112-7.
8. Tang C, Yang D, Liao H, Sun H, Liu C, Wei L, et al. Edible insects as a food source: a review. 2019;1(1):1-13.
9. Moruzzo R, Riccioli F, Espinosa Diaz S, Secci C, Poli G, Mancini SJA. Mealworm (*Tenebrio molitor*): potential and challenges to promote circular economy. 2021;11(9):2568.
10. Johnson GL, Lapadat RJS. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. 2002;298(5600):1911-2.
11. Martín-Núñez E, Donate-Correa J, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernández C, Navarro-González JFJWjoc. Implications of Klotho in vascular health and disease. 2014;6(12):1262.
12. Zhou X, Wang XJJocr, oncology c. Klotho: a novel biomarker for cancer. 2015;141:961-9.
13. Patel AA, Torres DM, Harrison SAJJocg. Effect of weight loss on nonalcoholic fatty liver disease. 2009;43(10):970-4.
14. Holloszy JO, Coyle EFJJoap. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. 1984;56(4):831-8.
15. Belluco S, Losasso C, Maggioletti M, Alonzi CC, Paoletti MG, Ricci AJCrifs, et al. Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. 2013;12(3):296-313.
16. Lee J-B, Kwon D-K, Jeon Y-J, Song Y-JJJoPI. Mealworm (*Tenebrio molitor*)-derived protein supplementation attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb casting immobilized rats. 2021;64(5):211-7.
17. Charan J, Kantharia NJJoP, Pharmacotherapeutics. How to calculate sample size in animal studies? 2013;4(4):303-6.
18. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LCJO. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. 2007;15(4):798-808.
19. Hwang S-Y, Hong S-B, Chang C-SJKJCLS. Evaluation of DiaSys Reagents for Routine Chemical Tests. 2001;33(2):119-28.
20. Zhang H-J, He J, Pan L-L, Ma Z-M, Han C-K, Chen C-S, et al. Effects of Moderate and Vigorous Exercise on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Internal Medicine*. 2016;176(8):1074-82.
21. Huis Av, Itterbeeck JV, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, et al. Edible insects: future prospects for food and feed security. 2013.
22. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004;37(2):112-9.
23. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
24. Li J, Wang Z, Li C, Song Y, Wang Y, Bo H, et al. Impact of exercise and aging on mitochondrial homeostasis in skeletal muscle: roles of ROS and epigenetics. 2022;11(13):2086.
25. Williamson D, Gallagher P, Harber M, Hollon C, Trappe SJJop. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. 2003;547(3):977-87.
26. Kuro-o M, Matsumura Y, Arawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. 1999;12(10):703-7.
27. Liu Q-f, Yu L-x, Feng J-h, Sun Q, Li S-s, Ye J-MJDM. The prognostic role of klotho in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. 2019;2019(1):6468729.
28. 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. 2015;63(1):174-82.
29. de Lira CT, dos Santos MA, Gomes PP, Fidelix YL, Dos Santos AC, Tenório TR, et al. Aerobic training performed at ventilatory threshold improves liver enzymes and lipid profile related to non-alcoholic fatty liver disease in adolescents with obesity. 2017;23(4):281-8.
30. Sharifi N, Amani R, Hajiani E, Cheraghian BJE. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. 2014;47:70-80.
31. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JRJC. Integrative biology of exercise. 2014;159(4):738-49.
32. Campbell WW, Leidy HJJJotACoN. Dietary protein and resistance training effects on muscle and body composition in older persons. 2007;26(6):696S-703S.
33. Hulmi JJ, Lockwood CM, Stout JRJN, metabolism. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. 2010;7:1-11.

## Effect of Endurance Training and Mealworm Supplementation on Mapk and $\alpha$ Klotho Gene Expression and Skeletal Muscle Tissue Changes in Rats with Non-alcoholic Fatty Liver

Mounesan A<sup>\*1</sup>, Rahimi A<sup>2</sup>, Aghaei F<sup>3</sup>, Sarshin A<sup>3</sup>

1- \*Corresponding author: PhD student Faculty of Sports Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran Email: amir.mounesan@gmail.com

2- Associate Professor Faculty of Sports Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran

3- Assistant Professor Faculty of Sports Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran

Received 4 Feb, 2025

Accepted 20 May, 2025

**Background and Objectives:** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is one of the most common liver disorders associated with fat accumulation in the liver in the absence of alcohol consumption. Endurance training and dietary supplements—such as insect-derived proteins like mealworm—may be effective in improving NAFLD. This study aimed to investigate the effects of endurance training and mealworm supplementation on the expression of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and alpha-Klotho ( $\alpha$ Klotho) genes and muscle tissue alterations in rats with NAFLD.

**Materials & Methods:** In this experimental study, 15 male Wistar rats ( $250 \pm 50$  g) were randomly divided into five groups: healthy control, NAFLD, NAFLD + training, NAFLD + supplement, and NAFLD + training + supplement. NAFLD was induced over 8 weeks using a high-fat diet. The endurance training protocol consisted of treadmill running 5 days per week. Mealworm protein supplement was administered by gavage at a dose of 20 mg/kg body weight, 5 days per week. Gene expression of MAPK and  $\alpha$ Klotho was assessed using Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

**Results:** Endurance training and mealworm supplementation independently led to a significant increase in MAPK and  $\alpha$ Klotho gene expression ( $p < 0.001$ ). Each intervention also significantly increased the number and diameter of muscle fibers ( $p < 0.001$ ), but their combined effect was not statistically significant ( $p = 0.941$  and  $p = 0.688$ , respectively). SGPT and ALP enzyme levels significantly decreased ( $p < 0.01$ ), while SGOT levels showed no significant change.

**Conclusion:** Endurance training and mealworm supplementation had a beneficial effect on the expression of genes related to cellular signaling pathways and liver function. However, their combined intervention did not result in significant structural changes in skeletal muscle. These findings may serve as a foundation for future research on the treatment of NAFLD.

**Keywords:** Endurance training, Mealworm protein supplement, Dietary supplement, Non-alcoholic fatty liver disease, MAPK,  $\alpha$ Klotho