

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرین هوازی و مکمل عصاره سیر کهنه بر بیان ژن NFκB و TLR4 در بافت چربی احشایی و تغییرات پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی چاق

پریسا خبیری^۱، محمد رحمان رحیمی^{۱*}، ایرج رشیدی^۲، سید ارشاد ندایی^۳

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی و اجتماعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲. گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

دریافت: ۱۴ آبان ۱۴۰۱

پذیرش: ۷ آذر ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف: التهاب خفیف مزمن یک وضعیت رایج در چاقی است. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر عصاره سیر کهنه و تمرین هوازی بر بیان ژن مسیر سیگنالینگ التهابی TLR4/NFκB در چربی احشایی موش‌های صحرایی نر چاق بود.

روش کار: تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داولی به مدت نه هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (۳۲ سر) و استاندارد (۸ سر) قرار گرفتند. پس از القای چاقی در موش‌های گروه رژیم غذایی پرچرب، موش‌های این گروه به چهار زیرگروه: کنترل چاق (OC)، مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه (AGE)، تمرین هوازی (AT) و مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی (AGE + AT) تقسیم شدند (هر گروه ۸ سر). موش‌های رژیم غذایی استاندارد (C) نیز به رژیم غذایی خود ادامه دادند و مداخلات به مدت هشت هفته ادامه یافت. عصاره سیر کهنه یک مرتبه در روز، با دوز ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از طریق گاواژ به موش‌ها خوراند می‌شد. تمرین هوازی نیز شامل پنج روز دویدن در هفته روی تردمیل بود. بیان ژن‌های TLR4 و NFκB از طریق Real-time PCR و به منظور بررسی تغییرات پروفایل لیپیدی، پلاسما مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: تمامی مداخلات منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن TLR4 و NFκB چربی احشایی و همچنین بهبود پروفایل لیپیدی موش‌های چاق شدند ($p = 0/001$). کاهش TLR4 در گروه AGE + AT در مقایسه با سایر مداخلات بیشتر بود ($p = 0/001$). از طرف دیگر، AGE و AGE + AT در مقایسه با AT سبب کاهش بیشتر بیان ژن NFκB شدند ($p = 0/001$). AGE + AT نیز در مقایسه با سایر مداخلات پروفایل لیپیدی را بیشتر بهبود بخشید ($p = 0/001$).

نتیجه‌گیری: ترکیب مداخلات در کاهش بیان ژن TLR4 و NFκB چربی احشایی و همچنین بهبود پروفایل لیپیدی موثرتر است.

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، چاقی، عصاره سیر کهنه، فاکتور رونویسی هسته‌ای کاپای بی، گیرنده شبه تول ۴

مقدمه

چاقی یک مسئله مهم سلامت همگانی است و اغلب منجر به التهاب سیستمیک با درجه پایین^۱ می‌شود و خطر ابتلا به چندین بیماری مزمن را افزایش می‌دهد [۱]. تجمع چربی در سلول‌های چربی (آدیپوسیت‌ها) به دنبال دریافت بیش از حد کالری بارزترین ویژگی چاقی است. در وضعیت چاقی تعداد و اندازه آدیپوسیت‌ها افزایش می‌یابد، تری‌گلیسرید تجمع می‌یابد

و یک سری از سایتوکین‌ها و آدیپوکین‌ها را ترشح می‌کنند که منجر به اختلال در عملکرد سلول‌های ایمنی ذاتی و انطباقی می‌شوند [۱]. چربی احشایی موضعی بیشتر از تجمع کلی چربی در بدن به التهاب مزمن با درجه پایین کمک می‌کند، زیرا افزایش میزان چربی احشایی، به ویژه در شکم و کبد، به معنی نفوذ بیشتر ماکروفاژها و افزایش سطح سایتوکین‌های التهابی است؛ بنابراین، کاهش چربی احشایی نشانگرهای التهابی را

¹ Low-grade systemic inflammation

* نویسنده مسئول مکاتبات: p.khabiri@uok.ac.ir (ORCID: 0000-0002-1217-3115)

r.rahimi@uok.ac.ir (ORCID: 0000-0002-4302-1472)

علیرغم نشان دادن اثرات هم افزایی تمرین هوازی و عصاره سیر در بهبود فشار خون [۱۰] و شاخص‌های متابولیکی [۱۱]، تاکنون مطالعه‌ای به بررسی تاثیر عصاره سیر کهنه و تمرین هوازی بر شاخص‌های التهابی TLR4 و NFkB نپرداخته است. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر تمرین هوازی و مکمل عصاره سیر کهنه بر بیان ژن نشانگرهای التهابی در بافت چربی احشایی و تغییرات پروفایل لیپیدی موش‌های صحرایی نر چاق انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور اجرای پژوهش حاضر چهل سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی هفت هفته‌ای با وزن تقریبی ۱۷۰ گرم از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) خریداری شدند. پس از انتقال به دانشکده پزشکی کرمانشاه موش‌ها در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف و تعداد ۴ موش در هر قفس، تحت شرایط استاندارد (چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعت، دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰-۶۰ درصد) نگهداری شدند. پس از یک هفته سازگاری با محیط جدید، موش‌ها به‌صورت تصادفی در دو گروه تغذیه با غذای پرچرب (۳۲ سر) و تغذیه با غذای معمولی (۸ سر)، به مدت نه هفته، قرار گرفتند. در پایان نه هفته و القای چاقی در موش‌های گروه تغذیه با رژیم غذایی پرچرب، موش‌های این گروه به‌صورت تصادفی به چهار زیرگروه (هر زیرگروه ۸ سر) شامل گروه کنترل چاق (تغذیه با غذای پرچرب) (OC)، گروه مکمل عصاره سیر کهنه (تغذیه با غذای پرچرب + مکمل عصاره سیر کهنه) (AGE)، گروه تمرین هوازی (تغذیه با غذای پرچرب + تمرین هوازی) (AT) و گروه مکمل عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی (تغذیه با غذای پرچرب + مکمل عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی) (AT + AGE) تقسیم شدند و مداخلات به مدت هشت هفته ادامه یافت. موش‌های گروه کنترل استاندارد (تغذیه با غذای معمولی) (C) نیز رژیم غذایی معمولی را به مدت هشت هفته ادامه دادند. رژیم غذایی معمولی شامل ۱۰ درصد چربی، ۷۰ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین بود. بعلاوه، رژیم غذایی پرچرب شامل ۶۰ درصد چربی، ۲۰ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین بود که به سفارش پژوهشگر توسط مرکز پلت‌سازی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) تهیه شد. تمام مداخلات مرتبط با

کاهش می‌دهد و می‌تواند منجر به کاهش وزن شود [۲]. فعال شدن گیرنده شبه تول ۴ (TLR4)^۲ توسط اسیدهای چرب اشباع با زنجیره بلند یک فرایند مهم در درک چگونگی شروع التهاب توسط چاقی است و مسیر سیگنالینگ TLR4/NFkB^۳ یکی از مهم‌ترین مسیرهای انتقال سیگنال در شروع و توسعه التهاب است [۳]. سیگنالینگ با واسطه TLR4 منجر به فعال شدن فاکتور رونویسی هسته‌ای کاپای بی (NFkB)^۴ و تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود [۴]. اگر بتوان التهاب ناشی از چاقی را کاهش داد، عوارض جانبی و ابتلا به بیماری‌های مختلف ممکن است کمتر رخ دهد [۱].

مزایای تمرین ورزشی، که ناشی از تاثیرات ضدالتهابی تمرین است در مطالعات متعدد نشان داده شده است. تمرین هوازی (AT)^۵ مزمن سبب کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی پلاسما و افزایش تنظیم سیتوکین‌های ضدالتهابی می‌شود [۵]. سیر یک گیاه با خواص دارویی است که دارای فواید بالقوه مرتبط با سلامت می‌باشد و اثرات درمانی نشان می‌دهد. خواص درمانی سیر به دلیل محتوای بالای ترکیبات آلی گوگردی (OSCs)^۶ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن است که در مطالعات بسیاری نشان داده شده است [۶]. عصاره سیر کهنه (AGE)^۷ یک مکمل غذایی است که با عصاره‌گیری طولانی مدت (معمولاً به مدت ۲۰ ماه) سیر تازه در محلول اتانول آبی ۱۵ تا ۲۰ درصد تهیه می‌شود و نشان داده شده است که دارای خواص بیشتری نسبت به سیر تازه است [۷]. ترکیبات آلی گوگردی اس آلیل سیستئین (SAC)^۸ و اس آلیل مرکاپتوسیستئین (SAMC)^۹ که تنها در طی فرایند کهنه شدن سیر تولید می‌شوند مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره سیر کهنه می‌باشند [۶]. SAC فراوان‌ترین ترکیب آلی گوگردی و جزء فعال در عصاره سیر کهنه، نشان داده شده است دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌باشد [۸، ۹].

² Toll-like receptor 4

³ Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cell signaling pathway

⁴ Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cell

⁵ Aerobic training

⁶ Organosulfur compounds

⁷ Aged garlic extract

⁸ S-allylcysteine

⁹ S-allylmercaptocysteine

هفته‌ای گاواژ، تمامی موش‌ها ۲ روز، و هر روز یک مرتبه تحت آشنایی با گاواژ قرار گرفتند.

در پایان ۸ هفته و پس از گذشت ۴۸ ساعت از آخرین مداخلات، موش‌ها به مدت ۱۲ ساعت ناشتا بودند. سپس موش‌ها با تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از بیهوشی، خون‌گیری از قلب از طریق شکافتن قفسه سینه انجام شد. خون‌ها داخل لوله‌های خون‌گیری خلاء حاوی ماده EDTA^{۱۳} ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار هتیچ^{۱۴} (UNIVERSAL 320R) ساخت کشور آلمان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و سپس پلاسما جداسازی شد و پس از انتقال به داخل کرایوتیوب، تا زمان انجام آزمایش به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. همزمان کالبد شکافی انجام شده و بافت چربی احشایی (داخل حفره صفاقی، اطراف اندام‌های داخلی) جدا شد و پس از شستشو در نرمال سالین، بلافاصله در تانک ازت حاوی نیتروژن مایع، تا زمان انجام آزمایشات، ذخیره شد.

اندازه‌گیری متغیرهای بیوشیمیایی

توالی پرایمر ژن‌های مربوطه از سایت NCBI گرفته شد. پرایمر ژن‌های TLR4، NFκB و GAPDH توسط نرم افزار AlleleID ورژن ۷/۵ بررسی و انتخاب شد. اختصاصی بودن پرایمرهای مورد نظر به وسیله سایت NCBI، BLAST شد و پرایمرهای سفارش داده شده توسط شرکت بایونیر^{۱۵} کشور کره جنوبی آماده شد. توالی پرایمرها در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از خارج کردن بافت‌ها از تانک ازت، حدود ۲۵ میلی گرم بافت درون میکروتیوب RNase free له شد. محتوای RNA کل با استفاده از تریزول استخراج شد، سپس cDNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون^{۱۶} (First Strand cDNA synthesis kit) ساخت کشور ایران سنتز شد. میزان بیان ژن TLR4 و NFκB بافت چربی احشایی با تکنیک ریل تایم پی سی آر^{۱۷} سنجش شد و پس از کمی‌سازی مقادیر بیان

حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های موسسات ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه کردستان انجام شد (کد مصوب: IR.UOK.REC.1400.16).

پروتکل تمرینی

موش‌های گروه تمرینی (AT) و (AGE+AT)، با رعایت اصل اضافه بار، پنج روز در هفته، به مدت هشت هفته [۱۲] بر روی تردمیل تکنیک آزما^{۱۰} (TR-520) ساخت کشور ایران تمرین کردند. پروتکل تمرین شامل پنج روز آشناسازی موش‌ها با محیط و دستگاه نوارگردان بود که به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه و شیب صفر درصد انجام شد. لازم به ذکر است که به صورت هفتگی تا هفته چهارم ۵ دقیقه بر مدت زمان تمرین و ۳ متر بر دقیقه بر سرعت تمرین افزوده می‌شد و از هفته چهارم به بعد ۱۰ دقیقه بر مدت زمان تمرین هر هفته اضافه می‌شد و سرعت ۲۷ متر بر دقیقه حفظ شد و این سرعت تا پایان هفته هشتم حفظ شد. هر جلسه تمرین نیز ابتدا با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه شروع شد و هر دو دقیقه، سه متر بر دقیقه بر سرعت آن اضافه می‌شد. از هفته چهارم به بعد نیز در دقیقه ده، سرعت دستگاه به ۲۷ متر بر دقیقه می‌رسید. در پایان جلسات تمرینی، سرعت دستگاه در مدت ۳ دقیقه، به منظور سرد کردن موش‌ها، به آرامی کاهش پیدا می‌کرد [۱۳]. جزئیات پروتکل تمرین هوازی موش‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

مکمل عصاره سیر کهنه

عصاره سیر کهنه مورد استفاده در این پژوهش به شکل کپسول‌های ۶۰۰ میلی گرمی با نام تجاری کیولیک^{۱۱}، محصول شرکت واکوناگا^{۱۲} کشور آمریکا بود. موش‌های گروه مکمل‌دهی (AGE) و (AGE + AT) (۳۰ دقیقه قبل از فعالیت ورزشی)، با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم [۱۴] هر روز، یک مرتبه، به مدت ۸ هفته، از طریق گاواژ، محتوای هر کپسول حاوی عصاره سیر کهنه حل شده در آب را دریافت می‌کردند. به موش‌های گروه‌های دیگر نیز، هر روز به مدت ۸ هفته، یک مرتبه، از طریق گاواژ آب خورنده می‌شد. پیش از شروع پروتکل ۸

¹³ Ethylenediamine tetraacetic acid

¹⁴ Hettich

¹⁵ BIONEER

¹⁶ SinaClon

¹⁷ Real time-PCR

¹⁰ Technic Azma

¹¹ Kyolic

¹² Wakunaga

جدول ۱- پروتکل تمرین هوازی

سازگاری	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
سرعت (متر/دقیقه)	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۴	۲۷	۲۷	۲۷
زمان (دقیقه)	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۵	۵۵	۶۰

نسخه ۲۲ انجام شد و سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بیان ژن TLR4 در بافت چربی احشایی

تغذیه با غذای پرچرب سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن TLR4 در بافت چربی احشایی موش‌های گروه کنترل چاق در مقایسه با گروه کنترل استاندارد شد ($p = 0.001$). تمامی مداخلات (مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه، تمرین هوازی، مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی) سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن TLR4 در بافت چربی احشایی موش‌های چاق در مقایسه با گروه کنترل چاق شدند (تمامی مداخلات با $p = 0.001$). در مقایسه بین مداخلات مختلف، کاهش بیان ژن TLR4 در بافت چربی احشایی موش‌های چاق، تفاوت معنی‌داری را در مقایسه بین گروه مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه و گروه تمرین هوازی نشان نداد ($p = 0.2$). گروه مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی در مقایسه با سایر گروه‌ها (گروه مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه و گروه تمرین هوازی به طور معنی‌داری سبب کاهش بیشتر بیان ژن TLR4 در بافت چربی احشایی موش‌های چاق شد ($p = 0.001$ ، نمودار الف).

جدول ۲- توالی پرایمرها

نام ژن	پرایمر	توالی
TLR4	پیشرو	GGCATCATCTTCATTGTCCTTG
	معکوس	AGCATTGTCCTCCCACTCG
NFkB	پیشرو	TCTTCAACATGGCAGACGAC
	معکوس	CTCTCTGTTTCGGTTGCTCT
GAPDH	پیشرو	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	معکوس	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تجزیه و تحلیل شد. واکنش با استفاده از کیت شرکت سیناکلون (SyberBlue) ساخت کشور ایران، در دستگاه ریل تایم پی سی آر (Corbett, RG-6000 model)، ساخت کشور آمریکا، طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

کلسترول تام (TC)^{۱۸} با استفاده از کیت شرکت سیگما آلدریج^{۱۹} ساخت کشور آمریکا با شماره کاتالوگ MAK043، تری‌گلیسرید (TG)^{۲۰} با استفاده از کیت شرکت سیگما آلدریج ساخت کشور آمریکا با شماره کاتالوگ MAK266 و لیپوپروتئین با چگالی زیاد (HDL)^{۲۱} با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون، ساخت کشور ایران، با روش فتومتریک و بر اساس دستورالعمل‌های موجود در بروشور سنجیده شدند. لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)^{۲۲} با استفاده از فرمول فریدوالد^{۲۳}، به ترتیب زیر محاسبه شد:

لیپوپروتئین با چگالی کم = کلسترول تام - (لیپوپروتئین با چگالی زیاد - تری‌گلیسرید ÷ ۵)

به منظور ارزیابی تغییرات وزن بدن نیز وزن موش‌های صحرایی هر هفته با ترازوی دیجیتال مورد سنجش قرار می‌گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون شاپیرو ویلک برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها و از آزمون لوین برای بررسی همگنی واریانس‌ها استفاده شد. از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی برای بررسی مقایسه تغییرات بین گروه‌ها استفاده شد. تمام عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS

¹⁸ Total cholesterol

¹⁹ Sigma-Aldrich

²⁰ Triglyceride

²¹ High-density lipoprotein

²² Low-density lipoprotein

²³ Friedewald

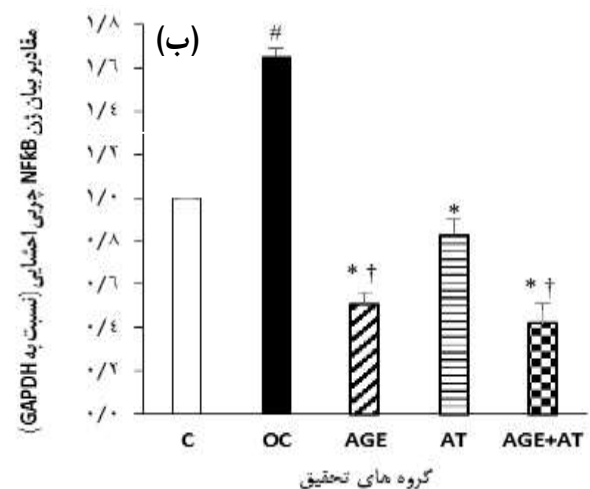
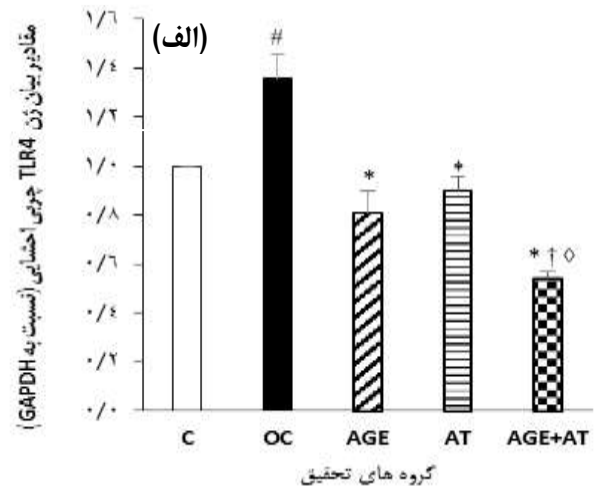
مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی) سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن NFκB در بافت چربی احشایی موش‌های چاق در مقایسه با گروه کنترل چاق شدند (تمامی مداخلات با $p = 0/001$). مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه و همچنین تمرین هوازی، به طور معنی‌داری سبب کاهش بیشتر بیان ژن NFκB در بافت چربی احشایی موش‌های چاق شدند ($p = 0/001$)، اما تفاوت معنی‌داری در کاهش بیان ژن NFκB در بافت چربی احشایی بین گروه مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه در مقایسه با گروه مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی مشاهده نشد ($p = 0/173$ ، نمودار ۱ب).

پروفایل لیپیدی

تغذیه با غذای پرچرب سبب افزایش معنی‌دار کلسترول تام، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی کم و کاهش معنی‌دار لیپوپروتئین با چگالی زیاد شد ($p = 0/001$). تمامی مداخلات (مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه، تمرین هوازی، مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی) سبب کاهش معنی‌دار کلسترول تام (تمامی مداخلات با $p = 0/001$)، تری‌گلیسرید (به ترتیب $p = 0/001$ ، $p = 0/020$ ، $p = 0/001$)، لیپوپروتئین با چگالی کم (به ترتیب $p = 0/009$ ، $p = 0/037$ ، $p = 0/001$) و افزایش معنی‌دار لیپوپروتئین با چگالی زیاد (به ترتیب $p = 0/025$ ، $p = 0/005$ ، $p = 0/001$) در مقایسه با گروه کنترل چاق شدند. در مقایسه بین مداخلات مختلف مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی به طور معنی‌داری سبب کاهش بیشتر کلسترول تام ($p = 0/011$)، تری‌گلیسرید ($p = 0/001$) و لیپوپروتئین با چگالی کم ($p = 0/046$) در مقایسه با تمرین هوازی شد. اما در رابطه با افزایش لیپوپروتئین با چگالی زیاد تفاوت معنی‌داری بین مداخلات مختلف مشاهده نشد. جدول ۳ جزئیات تغییرات پروفایل لیپیدی در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

وزن بدن

رژیم غذایی پرچرب به مدت نه هفته منجر به افزایش معنی‌دار وزن بدن نسبت به رژیم غذایی معمولی شد ($p = 0/001$). تمامی مداخلات (مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه، تمرین هوازی، مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه +



نمودار ۱- تاثیر هشت هفته مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه و تمرین هوازی بر بیان ژن TLR4 (الف) و NFκB (ب) بافت چربی احشایی موش‌های چاق. C: گروه کنترل استاندارد. OC: گروه کنترل چاق. AGE: گروه تغذیه با غذای پرچرب + مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه. AT: گروه تغذیه با غذای پرچرب + تمرین هوازی. AGE + AT: گروه تغذیه با غذای پرچرب + مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی. ستون‌ها مقادیر میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین را نشان می‌دهند. #: تفاوت معنی‌دار با گروه C با $p < 0/01$. *: تفاوت معنی‌دار با گروه OC با $p < 0/01$. †: تفاوت معنی‌دار با گروه AT با $p < 0/01$. ◇: تفاوت معنی‌دار با گروه AGE با $p < 0/01$.

بیان ژن NFκB در بافت چربی احشایی

تغذیه با غذای پرچرب سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن NFκB در بافت چربی احشایی موش‌های گروه کنترل چاق در مقایسه با گروه کنترل استاندارد شد ($p = 0/001$). تمامی مداخلات (مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه، تمرین هوازی،

جدول ۳- تاثیر هشت هفته مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه و تمرین هوازی بر پروفایل لیپیدی موش‌های چاق

گروه	کلسترول تام (میلی گرم بر دسی لیتر)	تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	لیپوپروتئین با چگالی کم (میلی گرم بر دسی لیتر)	لیپوپروتئین با چگالی زیاد (میلی گرم بر دسی لیتر)
C	۸۲/۳ ± ۶/۵	۹۱/۸ ± ۷/۳	۲۴/۲ ± ۴/۶۱	۴۰/۲ ± ۳/۱
OC	۱۱۳/۲ ± ۴/۷ #	۱۵۱/۴ ± ۱۰/۴ #	۵۸/۳ ± ۱۵/۵ #	۲۳/۶ ± ۷/۱ #
AGE	۱۰۱ ± ۲/۶ *	۱۲۴/۴ ± ۱۴/۱ *	۴۴ ± ۴/۲ *	۳۰/۳ ± ۲/۴ *
AT	۱۰۳/۸ ± ۲/۸ *	۱۳۵/۷ ± ۷ *	۴۶/۲ ± ۵/۶ *	۳۱/۷ ± ۳/۹ *
AGE + AT	۹۶/۳ ± ۳/۵ *†	۱۱۱/۲ ± ۷/۱ *††	۳۴/۴ ± ۳/۷ *†	۳۴/۲ ± ۲/۹ *

C: گروه کنترل استاندارد. OC: گروه کنترل چاق. AGE: گروه تغذیه با غذای پرچرب + مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه. AT: گروه تغذیه با غذای پرچرب + تمرین هوازی. AGE+AT: گروه تغذیه با غذای پرچرب + مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی. مقادیر بیانگر میانگین $\pm$ انحراف استاندارد از میانگین می‌باشند. #: تفاوت معنی‌دار با گروه C با $p < 0/01$. *: تفاوت معنی‌دار با گروه OC با $p < 0/01$. †: تفاوت معنی‌دار با گروه AT با $p < 0/05$. ††: تفاوت معنی‌دار با گروه AT با $p < 0/01$.

تمرین هوازی) سبب کاهش معنی‌دار وزن بدن نسبت به گروه کنترل چاق شدند (تمامی مداخلات با $p = 0/001$). در مقایسه بین مداخلات مختلف ترکیب مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه + انجام تمرین هوازی به طور معنی‌داری سبب کاهش بیشتر وزن بدن در مقایسه با گروه تمرین هوازی شد ($p = 0/002$). اما کاهش وزن بدن با تمرین هوازی با کاهش وزن ناشی از مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه تفاوت معناداری نداشت ($p = 0/080$). تغییرات وزن بدن موش‌های گروه‌های تحقیق در مراحل مختلف در جدول ۴ ارائه شده است.

بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ۸ هفته تمرین هوازی و مصرف مکمل عصاره سیر کهنه سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن TLR4 و NFkB در بافت چربی احشایی و بهبود پروفایل لیپیدی موش‌های صحرایی نر چاق می‌شود. تغذیه با غذای پرچرب منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ التهابی با واسطه NFkB می‌شود که در نهایت منجر به تولید سایتوکین‌های پیش التهابی می‌شود [۴]. گیرنده‌های شبه تول (TLRs) ^{۲۴} گیرنده‌های شناسایی الگو با توانایی تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن هستند. گیرنده شبه تول ۴ (TLR4) از طریق فعال شدن به واسطه لیگاندهای بیرونی و درونی، مانند اسیدهای چرب رژیم غذایی و اسیدهای چرب آزاد، در ایجاد التهاب مزمن نقش دارد [۴]. TLR4 ممکن است NFkB را فعال کرده و پاسخ‌های التهابی را افزایش دهد [۴].

²⁴ Toll-like receptors

NFkB به عنوان فاکتور رونویسی اولیه برای تنظیم تولید سایتوکین‌ها هنگام التهاب در نظر گرفته می‌شود [۴]. نشان داده شده است که تمرین با تردمیل سبب کاهش معنی‌دار بیان پروتئین TLR4 و NFkB در بافت چربی ایپیدیم موش‌های تمرین کرده می‌شود [۱۵]. در مطالعه ما کاهش TLR4 و NFkB به دنبال ورزش هوازی مزمن با نتایج مطالعات دیگر هم سو بود [۱۶، ۱۵]. در مطالعه کاونیشی^{۲۵} و همکاران [۵] شانزده هفته تمرین هوازی با تردمیل سبب کاهش بیان ژن TLR4 در بافت چربی موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب شد [۵]. نشان داده شده است که یک دوره ورزش طولانی مدت (مزمن) تولید سایتوکین‌های التهابی و بیان TLR4 در سطح مونوسیت‌ها را کاهش می‌دهد، که مکانیسم‌های احتمالی شامل فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (IGF-1)^{۲۶}، سایتوکین‌های ضد التهابی مانند اینترلوکین ۱۰ (IL-10)^{۲۷}، هورمون‌های استرس (گلوکوکورتیکوئیدها) و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)^{۲۸} است [۱۷]. علاوه، کاهش سطوح لیپو پلی ساکارید (LPS)^{۲۹} به دنبال تمرین استقامتی با شدت متوسط از دیگر عوامل مرتبط با کاهش کاهش بیان TLR4 و NFkB می‌باشد [۱۷].

از طرف دیگر، در مطالعه ما مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه نیز سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن TLR4 و NFkB در بافت چربی احشایی موش‌های چاق شد. عصاره سیر کهنه یکی

²⁵ Kawanishi

²⁶ Insulin-like growth factor 1

²⁷ Interleukin 10

²⁸ Heat Shock Proteins

²⁹ Lipopolysaccharide

جدول ۴- تاثیر هشت هفته مکمل دهی با عصاره سیر کهنه و تمرین هوازی بر وزن بدن موش‌های چاق

گروه	وزن هفته ۱ (گرم)	وزن هفته ۹ (گرم)	گروه	وزن هفته ۱۷ (پایان ۸ هفته مداخلة) (گرم)
تغذیه با غذای معمولی	189.2 ± 19.4	328.2 ± 7.7	C	394 ± 27.2
تغذیه با غذای پرچرب	194.8 ± 14	368.7 ± 10.2 #	OC	465.3 ± 9.2 #
			AGE	393.1 ± 32.4 *
			AT	354.6 ± 23.8 *
			AGE+AT	333.7 ± 41.4 * [∅]

C: گروه کنترل استاندارد. OC: گروه کنترل چاق. AGE: گروه تغذیه با غذای پرچرب + مکمل دهی با عصاره سیر کهنه. AT: گروه تغذیه با غذای پرچرب + تمرین هوازی. AGE + AT: گروه تغذیه با غذای پرچرب + مکمل دهی با عصاره سیر کهنه + تمرین هوازی. مقادیر بیانگر میانگین $\pm$ انحراف استاندارد از میانگین می‌باشند. # : تفاوت معنی‌دار با گروه C با $p < 0.01$. *: تفاوت معنی‌دار با گروه OC با $p < 0.01$. [∅]: تفاوت معنی‌دار با گروه AGE با $p < 0.01$.

از فرمولاسیون‌های سیر است که طی فرایند کهنه شدن، به دلیل تبدیل ترکیبات آلی گوگردی قوی به ترکیبات محلول در آب مانند SAC و SAMC، سیر تقریباً بدون بو می‌شود. تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی تاثیر عصاره سیر کهنه بر بیان ژن TLR4 و NFκB در بافت چربی احشایی موش‌های چاق نپرداخته است. SAC قادر به سرکوب آبشار سیگنالینگ TLR4 ناشی از LPS می‌باشد [۱۹، ۱۸] و فعال‌سازی NFκB را کاهش می‌دهد [۱۹]. در مطالعه ما، کاهش TLR4 و NFκB به دنبال مصرف عصاره سیر کهنه، با کاهش TLR4 و NFκB ناشی از مصرف SAC در سایر مطالعات هم‌سو بود [۸، ۹].

بدنبال تمرین هوازی و مصرف مکمل عصاره سیر کهنه نیز بهبود در پروفایل لیپیدی مشاهده شد. افزایش مصرف انرژی توسط فعالیت بدنی سبب بهبود پروفایل لیپیدی می‌شود. ورزش سبب کاهش پروتئین استیل کوآ کربوکسیلاز (ACC)^{۳۰} می‌شود که احتمالاً سبب کاهش مالونیل کوآ و در نهایت سبب اکسیداسیون اسیدهای چرب و همچنین کاهش سوبسترای در دسترس برای FAS^{۳۱} به منظور سنتز اسیدهای چرب می‌شود [۲۰]. از طرف دیگر، عصاره سیر کهنه AMPK^{۳۲} را فعال می‌کند [۲۱]. فعال‌سازی AMPK اثر آنتی لیپوژنیک^{۳۳} دارد [۲۲]. فعال‌سازی AMPK می‌تواند متابولیسم انرژی را تنظیم

کند، که با غیرفعال کردن ACC و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در بافت چربی سفید، مانع لیپوژنز^{۳۴} می‌شود [۲۳]. پیشنهاد شده است که برخی از ترکیبات سیر ممکن است به عنوان بازدارنده برخی آنزیم‌ها مانند هیدروکسی متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-CoA reductase)^{۳۵}، که در سنتز کلسترول شرکت می‌کند، عمل کنند و سبب کاهش کلسترول خون شوند [۲۴]. بعلاوه، افزایش سطح HDL بدنبال دوزهای بالای AGE و SAC در موش‌های تغذیه شده با غذای پرچرب می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت لسیتین-کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT)^{۳۶} باشد که به تنظیم چربی خون کمک می‌کند [۲۵]. در مطالعه ما ترکیب تمرین هوازی + مکمل عصاره سیر کهنه سبب بهبود بیشتری در پروفایل لیپیدی پلاسما در مقایسه با هر کدام از مداخلات به تنهایی شد، این با نتیجه مطالعه سئو^{۳۷} و همکاران هم راستا بود [۱۱]. علیرغم کنترل دقیق شرایط محیطی و آزمایشگاهی برای یکسان‌سازی بین گروه‌های تحقیق، فعالیت‌های شبانه ممکن است بین گروه‌های تحقیق تفاوت داشته باشد. عدم اندازه‌گیری حداکثر اکسیژن مصرفی به دلیل عدم دسترسی به تجهیزات لازم برای تنظیم دقیق شدت تمرین یکی از محدودیت‌های مطالعه ما بود. علاوه بر این، عدم اندازه‌گیری بیان پروتئین TLR4 و NFκB از دیگر محدودیت‌های تحقیق حاضر بود.

³⁴ Lipogenesis³⁵ 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase³⁶ Lecithin-cholesterol acyltransferase³⁷ Seo³⁰ Acetyl-CoA carboxylase³¹ Fatty acid synthase³² Adenosine monophosphate-activated protein kinase³³ Antilipogenic effect

گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، به جهت در اختیار گذاشتن امکانات، و تمامی افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ملاحظات مالی

انجام پژوهش حاضر هیچ گونه حمایت مالی دریافت نکرده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

پ.خ: ایده، انجام مطالعه، اجرای مطالعه، آنالیز آماری، نگارش مقاله؛ م.ر.ر: طراحی مطالعه، استاد راهنما و ناظر بر حسن اجرای مطالعه؛ ا.ر: طراحی مطالعه، استاد مشاور و ناظر بر حسن اجرای مطالعه؛ س.ا.ن: طراحی مطالعه، استاد مشاور و ناظر بر حسن اجرای مطالعه.

فهرست منابع

- [1] Xu C, Mathews AE, Rodrigues C, Eudy BJ, Rowe CA, O'Donoghue A, Percival SS, Aged garlic extract supplementation modifies inflammation and immunity of adults with obesity: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Nutr ESPEN* 24 (2018) 148-155.
- [2] Gálvez I, Navarro MC, Martín-Cordero L, Otero E, Hinchado MD, Ortega E, The influence of obesity and weight loss on the bioregulation of innate/inflammatory responses: macrophages and immunometabolism. *Nutrients* 14 (2022) 612.
- [3] Li Q, Verma IM, NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 725-734.
- [4] Shirvani H, Mirnejad R, Soleimani M, Arabzadeh E, Swimming exercise improves gene expression of PPAR- γ and downregulates the overexpression of TLR4, MyD88, IL-6, and TNF- α after high-fat diet in rat skeletal muscle cells. *Gene* 775 (2021) 145441.
- [5] Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K, Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice.

بنابراین، توصیه می‌شود در مطالعات آینده اندازه‌گیری مقادیر بیان پروتئین مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه ما میزان بیان ژن TLR4 و NF κ B به دنبال ترکیب تمرین هوازی + مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه در بافت چربی احشایی، در مقایسه با هر کدام از مداخلات به تنهایی، کاهش بیشتری نشان داد. در رابطه با پروفایل لیپیدی نیز گروه ترکیب تمرین هوازی + مکمل‌دهی با عصاره سیر کهنه بهبود بیشتری نشان داد. با توجه به نتایج این مطالعه که همسو با مطالعات قبلی است، در صورت انجام مطالعات بیشتر و نیز انجام کارآزمایی‌های مناسب در انسان ممکن است بتوان از ترکیب تمرین هوازی و مصرف مکمل عصاره سیر کهنه برای بهبود التهاب ناشی از چاقی بهره برد.

سپاسگزاری

این مقاله از رساله دکتری تخصصی خانم پریسا خبیری، به شماره ۱۶۱۰۳۷۱ دانشجوی رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه کردستان استخراج شده است. بدین وسیله از گروه فیزیولوژی و

Exerc Immunol Rev 16 (2010) 105-118.

- [6] Venkatesh YP, Immunomodulatory attributes of aged garlic extract and its components. In: Hayat MA, Immunology, Volume 1: Immunotoxicology, Immunopathology, and Immunotherapy, London: Academic Press, 2018: 203-224.
- [7] Elost A, Slevin M, Rahman K, Ahmed N, Aged garlic has more potent antiglycation and antioxidant properties compared to fresh garlic extract in vitro. *Sci Rep* 7 (2017) 39613.
- [8] Roustae AM, Mirahmadi SMS, Shahmohammadi A, Ramzi S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M, S-allyl cysteine, an active ingredient of garlic, attenuates acute liver dysfunction induced by lipopolysaccharide/ d-galactosamine in mouse: underlying mechanisms. *J Biochem Mol Toxicol* (2020) 22518.
- [9] Baluchnejadmojarad T, Kiasalari Z, Afshin-Majd S, Ghasemi Z, Roghani M, S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *Eur J Pharmacol* 794 (2017) 69-76.
- [10] Bashiri J, The effect of regular aerobic exercise and garlic supplementation on lipid profile and blood pressure in inactive subjects. *Zahedan J Res Med Sci* 17 (2015) 961.

- [11] Seo DY, Lee S, Figueroa A, Kwak YS, Kim N, Rhee BD, Ko KS, Bang HS, Baek YH, Han J, Aged garlic extract enhances exercise-mediated improvement of metabolic parameters in high fat diet-induced obese rats. *Nutr Res Pract* 6 (2012) 513.
- [12] Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø, Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Prev Cardiol* 14 (2007) 753-760.
- [13] Brooks GA, White TP, Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45 (1978) 1009-1015.
- [14] Thomson MS, Al-Qattan KK, Js D, Ali M, Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 16 (2015) 17.
- [15] Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Tarini VA, Arida RM, Faloppa F, Alves ES, do Nascimento CO, Oyama LM, Seelaender M, de Mello MT, Santos RV, Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. *Lipids Health Dis* 9 (2010) 109.
- [16] Ma Y, He M, Qiang L, Exercise therapy downregulates the overexpression of TLR4, TLR2, MyD88 and NF- κ B after cerebral ischemia in rats. *Int J Mol Sci* 14 (2013) 3718-3733.
- [17] Cavalcante PAM, Gregnani MF, Henrique JS, Ornellas FH, Araújo RC, Aerobic but not resistance exercise can induce inflammatory pathways via Toll-Like 2 and 4: a systematic review. *Sports Med Open* 3 (2017) 42.
- [18] Youn H-S, Lim HJ, Lee HJ, Hwang D, Yang M, Jeon R, Ryu J-H, Garlic (*Allium sativum*) Extract Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Toll-Like Receptor 4 Dimerization. *Biosci Biotechnol Biochem* 72 (2008) 368-375.
- [19] Khajevand-Khazaei M-R, Azimi S, Sedighnejad L, Salari S, Ghorbanpour A, Baluchnejadmojarad T, Mohseni-Moghaddam P, Khamse S, Roghani M, S-allyl cysteine protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the C57BL/6 mouse strain: Involvement of oxidative stress and inflammation. *Int Immunopharmacol* 69 (2019) 19-26.
- [20] Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, Ibdah JA, Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294 (2008) G619-G626.
- [21] Miki S, Inokuma Ki, Takashima M, Nishida M, Sasaki Y, Ushijima M, Suzuki Ji, Morihara N, Aged garlic extract suppresses the increase of plasma glycated albumin level and enhances the AMP-activated protein kinase in adipose tissue in TSOD mice. *Mol Nutr Food Res* 61 (2017) 1600797.
- [22] Lee M-S, Kim I-H, Kim C-T, Kim Y, Reduction of body weight by dietary garlic is associated with an increase in uncoupling protein mRNA expression and activation of AMP-activated protein kinase in diet-induced obese mice. *J Nutr* 141 (2011) 1947-1953.
- [23] Yin W, Mu J, Birnbaum MJ, Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis In 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 278 (2003) 43074-43080.
- [24] Gebhardt R, Beck H, Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids* 31 (1996) 1269-1276.
- [25] Asdaq SMB, Antioxidant and hypolipidemic potential of aged garlic extract and its constituent, s-allyl cysteine, in rats. *Evid Based Complement Altern Med* 2015 (2015) 328545.1.

Research paper

Effect of aerobic training and aged garlic extract supplementation on TLR4 and NFκB gene expression in visceral adipose tissue and lipid profile changes in obese male rats

Parisa Khabiri^{1*}, Mohammad Rahman Rahimi^{1*}, Iraj Rashidi², Seyed Ershad Nedaei³

1. Department of Exercise Physiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2. Department of Anatomical Sciences and Cell biology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3. Department of Physiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Received: 5 November 2022

Accepted: 28 November 2022

Abstract

Background and Aim: Chronic low-grade inflammation is a common condition in obesity. The aim of the present study was to investigate the effects of aged garlic extract and aerobic training on TLR4/NFκB inflammatory signaling pathway gene expression in obese male rats.

Methods: Forty male Sprague-Dawley rats were subjected to high-fat diet (n = 32) and standard diet group (n = 8) for 9 weeks. After inducing obesity in the rats fed high-fat diet, the rats of this group were divided into four subgroups (n = 8), including the obese control (OC), the supplemented with aged garlic extract (AGE), the aerobic training (AT), and the supplemented with aged garlic extract + aerobic training (AGE + AT). The rats in the standard diet group also continued their diet for 8 weeks and interventions continued for 8 weeks. AGE was fed to rats once daily at a dose of 600 mg/kg by gavage. AT also included running on a treadmill five days a week. The TLR4 and NFκB gene expression was measured by Real-time PCR and lipid profile changes evaluated in plasma.

Results: All interventions led to a significant decrease in TLR4 and NFκB gene expression in visceral fat, as well as improving the lipid profile of obese rats ($p = 0.001$). TLR4 reduction was higher in AGE + AT group ($p = 0.001$). On the other hand, AGE and AGE + AT caused a greater decrease in NFκB gene expression compared to AT ($p = 0.001$). AGE + AT also improved the lipid profile more compared to other interventions ($p = 0.001$).

Conclusion: The combining of interventions is more effective in reducing TLR4 and NFκB gene expression in visceral fat as well as improving lipid profile.

Keywords: Aerobic training, Obesity, Aged garlic extract, NFκB, TLR4

Please cite this article as follows:

Khabiri P, Rahimi MR, Rashidi I, Nedaei SE, Effect of aerobic training and aged garlic extract supplementation on TLR4 and NFκB gene expression in visceral adipose tissue and lipid profile changes in obese male rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 6 (2022) 201-210.

*Corresponding authors: p.khabiri@uok.ac.ir (ORCID: 0000-0002-1217-3115)
r.rahimi@uok.ac.ir (ORCID: 0000-0002-4302-1472)