

Original article

The effect of 8 weeks of continuous exercise combined with omega-3 consumption on the expression of some bile acid transporters and the amount of bile acids in the liver tissue of non-alcoholic fatty liver model mice

Running title: The effect of exercise and omega-3 on bile acid transporters and acids in fatty liver

Hamid Mohammadi¹, Rouhollah Ranjbar^{1*}, Mohammad Tabandeh Reza¹, Abdolhamid Habibi²

1 Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2 Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

Background and Purpose: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common metabolic disorders associated with fat accumulation, inflammation, and impaired bile acid metabolism. Alterations in the expression of hepatic bile acid transporters play an important role in the progression of this disease. The aim of the present study was to investigate the effect of eight weeks of moderate-intensity continuous exercise combined with omega-3 supplementation on the expression of bile acid transporters and bile acid levels in the liver tissue of mice with NAFLD.

Materials and Methods: Thirty adult male Wistar rats were randomly divided into five groups: healthy control, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), NAFLD with moderate-intensity continuous exercise (MICT), NAFLD with omega-3 supplementation (OM3), and NAFLD with continuous exercise and omega-3. NAFLD was induced with a high-fat diet and 25% sucrose solution for 12 weeks. The continuous exercise protocol was performed four sessions per week for 8 weeks. The study variables included the expression of hepatic bile acid transporters (NTCP and BSEP), bile acid concentrations, blood glucose, and lipid profile. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test at a significance level of $P < 0.05$.

Results: NAFLD increased bile acids, impaired metabolic profile, and decreased expression of bile transporters ($P < 0.05$). Continuous exercise and omega-3 intake independently improved metabolic indices, decreased bile acids, and modulated NTCP and BSEP expression. The most favorable effects were observed in the combination group ($P < 0.05$).

Conclusion: The combination of continuous exercise and omega-3 supplementation by regulating bile acid homeostasis and improving liver function can be considered as an effective non-pharmacological strategy in the management of NAFLD.

Keywords: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Continuous training, Omega-3, Bile acid transporter, liver

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
۱۴۰۶، دوره ۱۹، شماره ۲، صفحه‌های ۲-۹

مقاله پژوهشی

تأثیر ۸ هفته تمرین تداومی به همراه مصرف امگا ۳ بر بیان برخی ناقلین اسید صفراوی و میزان اسیدهای صفراوی در بافت کبد موش های مدل کبد چرب غیرالکلی

حمید محمدی^۱، روح اله رنجبر^۱، عبدالحمید حبیبی^۱، محمدرضا تابنده^۲

۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

زمینه و هدف؛ بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیک است که با تجمع چربی، التهاب و اختلال در متابولیسم اسیدهای صفراوی همراه می‌باشد. تغییر در بیان ناقلین اسید صفراوی کبدی نقش مهمی در پیشرفت این بیماری دارد. هدف از مطالعه حاضر تأثیر هشت هفته تمرین تداومی با شدت متوسط به همراه مصرف مکمل امگا-۳ بر بیان ناقلین اسید صفراوی و میزان اسیدهای صفراوی در بافت کبد موش‌های مبتلا به NAFLD بود.

مواد و روش‌ها: ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ و بیستار به طور تصادفی به پنج گروه کنترل سالم، کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)، NAFLD همراه با تمرین تداومی با شدت متوسط (MICT)، NAFLD همراه با مکمل امگا-۳ (OM3) و NAFLD همراه با تمرین تداومی و امگا-۳ تقسیم شدند. القای NAFLD با رژیم غذایی پرچرب و مصرف محلول سوکروز ۲۵ درصد به مدت ۱۲ هفته انجام گرفت. پروتکل تمرین تداومی به مدت ۸ هفته، چهار جلسه در هفته اجرا شد. متغیرهای پژوهش شامل بیان ناقلین اسیدهای صفراوی کبدی (BSEP و NTCP)، غلظت اسیدهای صفراوی، قند خون و پروفایل لیپیدی بود. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج: NAFLD موجب افزایش اسیدهای صفراوی، اختلال پروفایل متابولیک و کاهش بیان ناقلین صفراوی شد. ($P < 0.05$) تمرین تداومی و مصرف امگا-۳ به طور مستقل باعث بهبود شاخص‌های متابولیک، کاهش اسیدهای صفراوی و تعدیل بیان BSEP و NTCP گردیدند. بیشترین اثرات مطلوب در گروه ترکیبی مشاهده شد ($P < 0.05$).

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
نتیجه گیری: ترکیب تمرین تداومی و مکمل امگا-۳ با تنظیم هموستاز اسیدهای صفراوی و بهبود عملکرد کبد می تواند به عنوان راهبردی
غیردارویی مؤثر در مدیریت NAFLD مطرح شود.

واژه های کلیدی: کبد چرب غیر الکلی، تمرین تداومی، امگا-۳، ناقلین اسید های صفراوی، کبد

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) شامل انواع بیماری های کبد چرب بالینی و پاتولوژیک، از استئاتوز ساده گرفته تا استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) است که می تواند منجر به سیروز و سرطان کبد شود (۱). NAFLD با تجمع و ذخیره بیش از حد چربی در سلول های کبدی در صورت عدم مصرف الکل مشخص می شود. NAFLD شایع ترین بیماری مزمن کبدی در سطح جهان است که ۱۵ تا ۴۰ درصد از جمعیت عمومی را تحت تأثیر قرار داده و حداقل ۱۰ تا ۲۰ درصد از این افراد به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) مبتلا می شوند (۲). در حال حاضر شیوع جهانی NAFLD ۳۰/۲ درصد در جمعیت بالغین تخمین زده شده است (۳). به نظر می رسد شیوع واقعی NAFLD به دلیل تغییرات رژیم غذایی، تمایل به سبک زندگی بی تحرک و افزایش سندرم متابولیک در سراسر جهان به طور قابل توجهی بالاتر است. مکانیسم های حفظ تعادل متابولیک، فعالیت بدنی و تغذیه، همگی ارتباط نزدیکی با بیماری NAFLD و سایر اختلالات و بیماری های متابولیک مانند چاقی، دیابت و اختلالات چربی خون دارند. دریافت کالری بیش از حد و عدم فعالیت بدنی، تعادل بین مسیرهای لیپوژنیک و لیپولیتیک کبد را مختل کرده و منجر به تجمع لیپیدها، به ویژه تری گلیسیریدها می شود (۴، ۵).

اسیدهای صفراوی ترکیباتی هستند که در کبد تولید می شوند و نقش مهمی در هضم چربی ها و جذب ویتامین های محلول در چربی دارند. اسیدهای صفراوی به دو دسته اصلی تقسیم می شوند: اسیدهای صفراوی اولیه و ثانویه. اسیدهای صفراوی اولیه مانند کولیک اسید و

¹ Non-alcoholic fatty liver disease

² non-alcoholic steatohepatitis

³ Cholic acid

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
کینودئوکسی کولیک اسید در کبد از کلسترول سنتز می‌شوند. این اسیدها پس از تولید در کبد، به صفرا ترشح می‌شوند و در روده‌ها به اسیدهای صفراوی ثانویه مانند دئوکسی کولیک اسید^۵ و لیتوکولیک^۴ اسید تبدیل می‌شوند. این فرآیند با کمک باکتری‌های روده‌ای انجام می‌شود. (۶، ۷)

فرآیند پیچیده‌ای برای حفظ هموستاز اسیدهای صفراوی در بدن وجود دارد. از جمله مکانیسم‌های اصلی هموستاز اسید صفراوی می‌توان به بازجذب اسیدهای صفراوی در روده اشاره کرد که از طریق ناقل‌های خاصی مانند ناقل هم‌انتقال‌دهنده سدیم-توروکولات^۷ و ناقل وابسته به سدیم اسیدهای صفراوی در سطح رأسی روده انجام می‌شود. این فرآیند از تجمع بیش از حد اسیدهای صفراوی در روده و کبد جلوگیری می‌کند و به حفظ تعادل آنها در بدن کمک می‌کند. اسیدهای صفراوی همچنین به‌عنوان سیگنال‌دهنده‌های متابولیک عمل می‌کنند. آنها از طریق گیرنده‌های مخصوص مانند گیرنده فارنزوئید^۸ و گیرنده جفت‌شونده با پروتئین G اسیدهای صفراوی در تنظیم متابولیسم کلسترول، چربی‌ها و گلوکز نقش دارند. FXR به‌ویژه در تنظیم تولید اسیدهای صفراوی و حفظ هموستاز کلسترول نقش دارد، زیرا بازخورد منفی بر سنتز اسیدهای صفراوی و کلسترول اعمال می‌کند (۸). هموستاز اسید صفراوی نقش مهمی در حفظ سلامت کبد و متابولیسم بدن ایفا می‌کند. اختلال در این هموستاز می‌تواند منجر به اختلالات متابولیک و بیماری‌های مزمن مانند NAFLD شود. در شرایط NAFLD، هموستاز اسید صفراوی مختل می‌شود. یکی از اثرات رایج در این بیماری، کاهش ترشح اسیدهای صفراوی از کبد به صفرا است که باعث می‌شود اسیدهای صفراوی در کبد تجمع یابند. این تجمع باعث تحریک التهاب، استرس اکسیداتیو و آسیب به هپاتوسیت‌ها می‌شود. در نتیجه، تولید لیپیدها در کبد افزایش می‌یابد که یکی از عوامل اصلی تجمع چربی در کبد است. علاوه بر این در بیماری NAFLD، بیان پروتئین FXR کاهش می‌یابد، که باعث کاهش بازخورد منفی بر سنتز اسیدهای صفراوی می‌شود. در نتیجه، سنتز اسیدهای صفراوی افزایش می‌یابد و ترشح آنها کاهش می‌یابد، که به تجمع چربی در کبد کمک می‌کند (۹).

گیرنده‌های اسید صفراوی در کبد نقش حیاتی در حفظ تعادل متابولیک و هموستاز صفراوی ایفا می‌کنند. گیرنده NTCP و BSEP از جمله گیرنده‌های مهم در فرآیندهای مربوط به جذب و ترشح اسیدهای صفراوی هستند. تغییرات در بیان این گیرنده‌ها می‌تواند تأثیرات عمده‌ای بر عملکرد کبد و پیشرفت بیماری‌هایی همچون NAFLD داشته باشد. NTCP یک ناقل اسید صفراوی است که در سلول‌های کبدی به‌ویژه در هپاتوسیت‌ها نقش مهمی در جذب اسیدهای صفراوی، به‌ویژه اسید تاروکولات ایفا می‌کند. در بیماران مبتلا به NAFLD، بیان این گیرنده ممکن است کاهش یابد. کاهش بیان NTCP می‌تواند باعث کاهش جذب اسیدهای صفراوی به سلول‌های کبدی شود که در نهایت منجر به

⁴ Chenodeoxycholic acid

⁵ Deoxycholic acid

⁶ Lithocholic acid

⁷ Sodium taurocholate co-transporting polypeptide; NTCP

⁸ Apical sodium-dependent bile acid transporter; ASBT

⁹ Farnesoid X receptor; FXR

¹ G protein-coupled bile acid receptor; TGR5

اختلال در تنظیم همئوستاز صفراوی و تجمع چربی در کبد می‌گردد. این تغییرات می‌تواند به افزایش تولید چربی در کبد و توسعه التهاب و فیبروز منجر شود که از علائم اصلی NAFLD هستند. (۱۰) به علاوه، کاهش NTCP می‌تواند موجب اختلال در سیگنال‌دهی اسید صفراوی و نقش آن در تنظیم متابولیسم چربی و گلوکز شود، که خود عاملی در ایجاد مقاومت به انسولین و سایر اختلالات متابولیک است. BSEP یک پروتئین است که مسئول ترشح اسیدهای صفراوی از هپاتوسیت‌ها به صفرا است. در شرایط NAFLD، کاهش بیان BSEP باعث تجمع اسیدهای صفراوی در کبد می‌شود. این تجمع می‌تواند منجر به آسیب اکسیداتیو و التهاب در کبد گردد و در نهایت به پیشرفت بیماری‌هایی مانند NAFLD و فیبروز کبدی کمک کند. همچنین، کاهش ترشح اسیدهای صفراوی از کبد می‌تواند موجب اختلال در فرآیندهای هضم و جذب چربی‌ها شود که این نیز تأثیر منفی بر عملکرد کبد و سلامت متابولیک می‌گذارد. (۱۱)

مطالعات اخیراً نشان داده اند که ورزش با شدت متوسط و شدید می‌تواند به طور مؤثر عملکرد سلول‌های کبدی را بازیابی، پروفایل لیپیدی، مقاومت به انسولین و آنزیم‌های کبدی را کاهش دهد. ورزش با شدت متوسط (تقریباً ۱۵۰ دقیقه در هفته) با کاهش التهاب کبد و استئاتوز کبدی در بیماران NAFLD مرتبط بوده است (۱۲). در موش‌هایی با رژیم غذایی پرچرب، ورزش منظم با کاهش سطح تری‌گلیسیرید، آسیب کبدی و اندازه قطرات چربی کبد همراه است. ورزش، به ویژه تمرین تداومی با شدت متوسط (MICT)^۱، تأثیر مثبتی بر متابولیسم لیپیدها و کاهش اختلال عملکرد کبد در اختلالات متابولیک مختلف، از جمله NAFLD، دارد. تمرین ورزشی MICT با تعدیل مسیرهای متابولیکی دخیل در سنتز و متابولیسم اسیدهای صفراوی مرتبط است و به طور بالقوه هموستاز اسیدهای صفراوی و سلامت کبد را بهبود می‌بخشد. تحقیقات نشان داده است که مداخله ۱۴ هفته‌ای ترکیبی از رژیم غذایی و تمرین هوازی منجر به کاهش سطوح سرمی اسیدهای صفراوی در زنان دارای مقاومت به انسولین شد. این شواهد نشان می‌دهند که فعالیت فیزیکی منظم و ظرفیت هوازی بالا ممکن است از طریق تغییر ترکیب یا سطح اسیدهای صفراوی به بهبود متابولیسم کبد و حساسیت به انسولین کمک کنند. اطلاعات موجود در خصوص تأثیر شدت تمرین بر هموستاز اسیدهای صفراوی محدود می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که تمرین شدید (استقامتی یا مقاومتی) سبب کاهش گذرای سطح اسیدهای صفراوی در سرم انسان می‌شود (۱۳). اخیراً مطالعه شی و همکاران (۲۰۲۵) نشان داده است که تمرین هوازی مداوم تأثیر بیشتری بر بهبود پارامترهای عملکرد کبدی و سطوح خاصی از اسیدهای صفراوی نسبت به تمرین مقاومتی یا ترکیب دو نوع تمرین دارد. (۱۳) بنابراین به نظر می‌رسد تمرین با شدت متوسط تا بالای هوازی و استمرار آن (تمرین تداومی) در زمینه متابولیسم اسید صفراوی و سلامت کبد مؤثرتر باشد تا تمرین مقاومتی منفرد یا ترکیبی با شدت متفاوت. تاکنون مطالعه‌ای که به بررسی تأثیر ورزش بر ناقلین اسید های صفراوی در کبد در شرایط NAFLD به‌پردازد انجام نشده است

¹ moderate-intensity continuous training

¹ Shi

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
 علاوه بر ورزش، اسیدهای چرب امگا ۳ به عنوان یک مداخله غذایی برای NAFLD توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند. تحقیقات اپیدمیولوژیک، یک ارتباط منفی بین مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ با بیماری‌های متابولیک، قلبی عروقی و NAFLD گزارش کرده‌اند (۱۴). اسیدهای چرب امگا ۳ با کاهش لیپوژنز کبدی، افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و بهبود هموستاز اسیدهای صفراوی، متابولیسم لیپید را تعدیل می‌کنند (۱۵). مطالعات اخیر گزارش داده‌اند که امگا ۳ آسیب سلول‌های کبدی را در موش‌های کلستاتیک مبتلا به انسداد مجرای صفراوی کاهش می‌دهد (۱۶، ۱۷). اسیدهای چرب غیراشباع مانند اسیدهای ایکوزاپنتانوئیک (EPA)^۱ و دوکوزاهگزانوئیک (DHA)^۱ همچنین بیان ژن‌های دخیل در سنتز، انتقال و متابولیسم اسیدهای صفراوی را در مدل‌های روده و سلول‌های کلیه انسان تعدیل می‌کنند. از سوی دیگر، اسیدهای چرب غیراشباع می‌توانند به عنوان یک عامل محافظتی در برابر تجمع متوسط اسیدهای صفراوی در شرایط کلستاز مزمن عمل می‌کنند (۱۸). با این حال، در حال حاضر هیچ مطالعه‌ای در مورد تأثیر ترکیبی تمرین تداومی با شدت متوسط و مصرف امگا ۳ بر بیان ناقلین اسیدهای صفراوی در دسترس نمی‌باشد. در پژوهش حاضر سعی شده است با بررسی و اندازه‌گیری عوامل درگیر در کبد چرب با مداخله مکمل امگا ۳ و تمرینات تداومی درک بهتری از مسیرهای متابولیک به دست آید. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی تعیین تأثیر ۸ هفته تمرین تداومی به همراه مصرف امگا ۳ بر بیان برخی ناقلین اسید صفراوی و میزان اسیدهای صفراوی در بافت کبد موش‌های مدل کبد چرب غیرالکلی می‌باشد.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: مطالعه حاضر از نوع پژوهش‌های تجربی با طرح پس‌آزمون شامل دو گروه کنترل (کنترل سالم و کنترل بیمار) و سه گروه تجربی (NAFLD+ تمرین تداومی، NAFLD+ تمرین تداومی+امگا ۳ و NAFLD+امگا ۳) بود. در این مطالعه تعداد ۳۰ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۶ سر در هر گروه)، از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز با دامنه وزنی ۱۸۰-۲۰۰ گرم خریداری و نگهداری شد. موش‌ها در شرایط استاندارد (دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد، چرخه ۱۲ ساعته روشنایی-تاریکی) با دسترسی آزاد به آب و غذا و براساس دستورالعمل نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. پس از یک هفته آشنایی و سازگاری با محیط جدید، موش‌های گروه کنترل سالم از یک رژیم غذایی استاندارد با ترکیب جیره نرمال بر اساس محتوای انرژی (چربی ۱۱٪، کربوهیدرات ۶۹٪، و پروتئین ۲۰٪) (خوراک پارس دام) تغذیه شدند. سایر موش‌های صحرایی به منظور القا NAFLD به مدت ۱۲ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (۴۵ درصد چربی، ۳۶ درصد کربوهیدرات و ۱۹ درصد پروتئین) از شرکت رویان اصفهان و ۲۵ درصد سوکروز در آب آشامیدنی قرار گرفتند (۱۹).

¹ Eicosapentaenoic 3
¹ Docosahexaenoic 4

روش اجرای پژوهش: به منظور آشناسازی با شرایط آزمایشگاه و نوارگردان، رت‌ها به مدت یک هفته، پنج روز در هفته و روزانه به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۵ تا ۱۵ متر در دقیقه روی نوارگردان دویدند. حداکثر اکسیژن مصرفی حیوانات، به دلیل عدم دسترسی به ابزار اندازه‌گیری مستقیم، با استفاده از آزمون فزاینده روی نوارگردان برآورد شد. به طوریکه ابتدا ۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد VO_{2max} انجام گرفت، که این شدت بر اساس سرعت متناظر با درصدی از VO_{2max} برآورد شده در آزمون فزاینده نوارگردان تعیین گردید. سپس رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه شروع به دویدن کردند و هر ۲ دقیقه یک بار به میزان ۲ متر بر دقیقه تا سر حد واماندگی سرعت افزایش یافت. عدم توانایی دویدن روی نوار گردان و رفتن به فضای انتهایی نوار گردان به عنوان پیشینه توان تمرین در نظر گرفته شد. بعد از به پایان رسیدن مرحله آشناسازی، سرعتی که موش‌ها در آن دویدند (آخرین سرعت در مرحله واماندگی) ثبت گردید.

پروتکل تمرین مداوم با شدت متوسط (MICT) بر اساس تحقیقات منتشر شده قبلی انجام شد (۲۰). جلسات تمرینی چهار روز در هفته و به مدت هشت هفته انجام شد. شدت تمرین بر اساس درصدی از سرعت پیشینه حاصل از آزمون فزاینده نوارگردان تعیین شد. هر جلسه با گرم کردن ۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۰ متر در دقیقه شروع شد و به دنبال آن دویدن مداوم با سرعت ۵۰ تا ۶۰ درصد سرعت پیشینه و با سرعت ۱۸ تا ۲۲ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. به منظور اعمال اضافه‌بار تدریجی، سرعت دویدن در طول دوره تمرین به صورت تدریجی افزایش یافت؛ به طوری که در هفته‌های اول شدت تمرین در محدوده پایین‌تر (۱۸ متر در دقیقه) آغاز شد و به تدریج تا پایان هفته هشتم به ۲۲ متر در دقیقه افزایش یافت، در حالی که مدت تمرین ثابت نگه داشته شد.

از مکمل امگا ۳ (Mega DHA® Vitafor، برزیل با ترکیب ۱۰٪ EPA و ۵۰٪ DHA) با دوز ۵۰۰ mg/kg به صورت گاوآژ روزانه به مدت ۸ هفته پس از القا NAFLD استفاده شد (۲۱).

روش های آزمایشگاهی: در پایان دوره، به منظور از بین بردن اثر حاد تمرین، نمونه گیری ها ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی و پس از ناشتایی شبانه انجام شد. پس از بیهوش کردن حیوانات با تزریق درون صفاقی ترکیبی از زایلانین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و کتامین (۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن)، خون گیری از قلب انجام شد. نمونه ها به منظور جداسازی سرم به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم به دست آمده برای انجام مراحل بعدی تحقیق در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد (°C) نگهداری شد. همچنین کبد نیز برداشته شده و در فریزر دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد (°C) به منظور آنالیز های بعدی نگهداری شد. بخشی از لوب میانی به منظور ارزیابی بافت شناسی در محلول فرمالین ۱۰ درصد به منظور تثبیت بافتی قرار داده شد.

سطوح سرمی پروفایل لیپیدی (کلسترول، تری‌گلیسیرید، لیپوپروتئین کم‌چگالی LDL و لیپوپروتئین پرچگالی HDL)، گلوکز خون و آنزیم‌های کبدی (ALT: آلانین آمینوترانسفراز، AST: آسپاراتات آمینوترانسفراز و ALP: فسفاتاز قلیایی) با استفاده از اتوانالایزر Hitachi 7600 (ژاپن) و کیت‌های تجاری Biorex Fars، ایران اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت‌ها برای کلسترول، تری‌گلیسیرید، LDL و HDL به ترتیب ۱، ۲، ۱ و ۱

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
 محمدی و همکاران

mg/dL و ضریب تغییرات درون کیت (CV) کمتر از ۵٪ بود. حساسیت کیت گلوکز ۲ mg/dL و CV <4% و حساسیت کیت‌های آنزیم‌های کبدی (ALT, AST, ALP) ۲، ۳ و ۵ U/L با CV کمتر از ۵٪ بود (Biorex Fars، ایران).

برای ارزیابی غلظت اسیدهای صفراوی در بافت کبد، ابتدا نمونه‌های بافت کبد با استفاده از هموژنایزر (Heidolph، آلمان) با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه و با استفاده از بافر فسفات بر روی یخ هموژنیزه و پس از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه، مایع رویی جداسازی و جهت ارزیابی مقادیر اسیدهای صفراوی استفاده شد. مقدار پروتئین در نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد. غلظت اسید کولیک و اسید کینودئوکسی کولیک اسید با استفاده از کیت ELISA مطابق با پروتکل شرکت سازنده (Cell Biolabs, Inc, USA) اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت CA و CDCA به ترتیب ۰٫۱ و ۰٫۵ µg/mL و ضریب تغییرات درون کیت (CV) کمتر از ۷٪ بود.

جهت مطالعات میکروسکوپی، به روش معمول تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر تهیه شدند و با روش هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند. در نهایت، اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon، YS100، ژاپن) با بزرگنمایی ۴۰ برابر به منظور ارزیابی تغییرات بافت‌شناسی، از جمله وجود سلول‌های التهابی، قطرات چربی در سلول‌های کبدی، خونریزی، آسیب سلولی و اتساع سینوزوئیدهای بین سلولی بررسی شدند (۳۸). تصاویر با استفاده از دوربین Microbion 10 و نرم افزار Microbion تهیه شد.

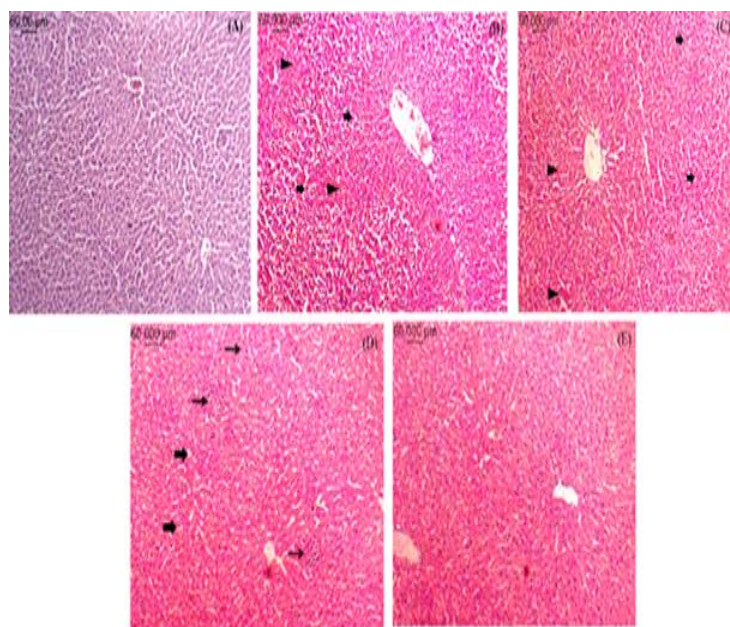
به منظور ارزیابی بیان ناقلین صفراوی BSEP و NTCP از روش وسترن بلات استفاده شد. به منظور انجام وسترن بلات ابتدا نمونه‌ها با استفاده از بافر لیز کننده RIPA و با استفاده از هموژنایزر، هموژنیزه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جهت آنالیزهای بعدی استفاده شد. میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد سنجیده شد. SDS-PAGE به روش متعارف با استفاده از ژل ۱۰٪ و سیستم بافری پیوسته انجام شد. پس از انجام SDS-PAGE نمونه‌ها با استفاده از روش متعارف و در دستگاه بلاتینگ (Padideh NowGene, Iran) به کاغذهای PVDF منتقل شد. آماده‌سازی کاغذها در بافر انتقال ۲ ساعت قبل از انجام آزمون انجام شد. پس از انتقال نمونه‌ها به کاغذهای بلاتینگ انجام مراحل شستشو و مسدودسازی با Skimed milk 5% انجام شد. بمنظور ردیابی پروتئینهای مورد نظر از آنتی بادی اولیه پلی کلونال ضد پروتئینهای BSEP (Santacruz Biotechnology, Inc, sc-51815) و NTCP (Santacruz Biotechnology, Inc, sc-74500) با رقت ۱/۵۰۰ و آنتی بادی ثانویه پلی کلونال ضد IgG خرگوش کانژوگه با HRP استفاده شد. آشکار سازی با استفاده از کیت ECL (پارس طوس، ایران) و دستگاه FUSION FX (Vilber، آمریکا) انجام شد. از پروتئین GAPDH بعنوان کالیبراتور استفاده شد. ارزیابی نسبت دانسیته باندهای پروتئینهای هدف نسبت به GAPDH با استفاده از نرم افزار FUSION FX انجام شد و نتایج با واحد قرار دادی و نسبت به بیان پروتئین کالیبراتور گزارش شد. (۴۲)

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۹ انجام شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه گردید. از آزمون شاپیرو ویلک برای نرمال بودن توزیع داده‌ها و از آزمون لون برای اطمینان از برابری واریانس‌ها استفاده شد. از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) برای بررسی تغییرات بین گروهی و همچنین از آزمون تعقیبی Tukey برای تشخیص تفاوت گروههای دوگانه استفاده شد. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

ارزیابی هیستوپاتولوژیک

نتایج مطالعه حاضر تغییرات قابل توجهی را در ساختار سلولی بافت کبد در موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب القایی نشان داد. هیپرتروفی سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) همراه با بزرگ شدن و یوکروماتینیزاسیون شدید هسته‌ها، بی‌نظمی طناب‌های کبدی به ویژه در اطراف ورید مرکزی همراه با اتساع مویرگ‌های سینوسی در این ناحیه و پرخونی، و وجود قطرات بزرگ چربی در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها به شکل دژنراسیون میکرو و ماکروواکوئلی و تورم شدید همراه با نفوذ گسترده سلول‌های التهابی تک هسته‌ای و اتساع فضای سینوسی مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده در گروه NAFLD پس از تمرین MICT، مصرف مکمل امگا ۳ و ترکیب تمرین MICT و مکمل امگا ۳ کاهش یافت. بهترین نتایج در گروه‌های NAFLD + مکمل امگا ۳ و NAFLD + مکمل امگا ۳ + MICT مشاهده شد. شایان ذکر است که این مشاهده صرفاً بر اساس بررسی کیفی نمونه‌های بافتی (مشاهده میکروسکوپی) و شدت ضایعات هیستولوژیک گزارش شده است؛ بنابراین، این نتایج باید به عنوان توصیف بصری و کیفی در نظر گرفته شوند (شکل ۱).



شکل ۱. تأثیر تمرین تداومی (MICT) و مکمل امگا ۳ بر ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک کبد موش‌های مبتلا به کبد چرب. (A) گروه کنترل: بافت کبد اکثر هپاتوسیت‌ها ساختار طبیعی دارند و هیچ عارضه خاصی ندارند، (B) گروه کبد چرب: کبد متورم سلولی (دژنراسیون واکوئلی) با درصد شدید در هپاتوسیت‌ها (فلش‌های سیاه) و پرخونی (فلش‌ها) با نفوذ سلول‌های التهابی گسترده و اتساع فضای سینوسی، (C) گروه کبد چرب + MICT: دریافت کبد تورم سلولی (دژنراسیون واکوئلار) (شاخص تجمع لیپیدی) با درصد کمتر نسبت به گروه کبد چرب در هپاتوسیت‌ها (مشکی) و پرخونی و نفوذ متوسط سلول‌های التهابی مشاهده می‌شود. (D) گروه کبد چرب + مکمل امگا: تورم سلولی (دژنراسیون واکوئلی) (شاخص تجمع چربی) با درصد متوسط در هپاتوسیت‌ها (فلش سیاه ضخیم) و پرخونی بالا (نوک سیاه باریک) و وجود خفیف سلول‌های تک هسته‌ای و (E) گروه کبد چرب + MICT + مکمل امگا ۳: دریافت کبد تورم سلولی (دژنراسیون واکوئلار) (شاخص تجمع چربی) با درصد متوسط در هپاتوسیت‌ها (پیکان مشکی ضخیم) و پرخونی (نوک مشکی باریک) و حضور خفیف سلول‌های تک هسته‌ای مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ۱۰۰×، نوار مقیاس = ۶۰ میکرومتر. NAFLD؛ بیماری کبد چرب غیرالکلی

پروفایل متابولیک، آنزیم‌های کبدی و سطح اسیدهای صفراوی

در مدل کبد چرب، پارامترهای متابولیک شامل گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL به‌طور قابل توجهی افزایش یافتند، در حالی که HDL کاهش نشان داد ($p < 0.05$)، که نشان‌دهنده اختلال متابولیک ناشی از NAFLD بود. مداخلات درمانی شامل MICT، مکمل امگا ۳ و ترکیب آن‌ها منجر به کاهش معنی‌دار گلوکز، LDL، کلسترول و تری‌گلیسرید شد و HDL تا حدی بهبود یافت، با بیشترین اثر در گروه ترکیبی MICT + امگا ۳.

همچنین، آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در گروه کبد چرب به‌طور قابل توجهی افزایش یافتند ($p < 0.05$)، در حالی که مداخلات درمانی باعث کاهش معنی‌دار آن‌ها شد. اسیدهای صفراوی کولیک و کینو دوکسی کولیک نیز در گروه کبد چرب افزایش یافتند و با مداخلات به‌ویژه ترکیبی، به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب تمرین MICT و مکمل امگا ۳ بیشترین اثر محافظتی را بر متابولیسم گلوکز و لیپید، عملکرد آنزیم‌های کبدی و تنظیم اسیدهای صفراوی دارد. (جدول ۱).

جدول ۱. اثرات MICT و مکمل امگا ۳ بر پارامترهای متابولیک، آنزیم‌های کبدی و اسیدهای صفراوی (میانگین $\pm$ SD)

متغیر	کنترل	NAFLD	NAFLD + MICT	NAFLD + OM3	NAFLD + MICT + OM3
گلوکز (mg/dl)	89.76 $\pm$ 3.05	180.0 $\pm$ 12.12 *	155.0 $\pm$ 14.00 †	145.0 $\pm$ 7.0 ‡	118.7 $\pm$ 8.32 §
کلسترول (mg/dl)	84.33 $\pm$ 7.09	193.3 $\pm$ 16.62 *	153.3 $\pm$ 10.97 †	120.0 $\pm$ 12.53 ‡	106.7 $\pm$ 11.24 §
تری گلیسرید (mg/dl)	57.38 $\pm$ 7.08	255.3 $\pm$ 28.08 *	202.4 $\pm$ 21.78 †	179.7 $\pm$ 10.89 ‡	111.8 $\pm$ 12.49 §
LDL (mg/dl)	25.38 $\pm$ 4.32	92.57 $\pm$ 13.63 *	69.25 $\pm$ 2.58 †	55.89 $\pm$ 6.20 ‡	50.33 $\pm$ 0.77 §
HDL (mg/dl)	46.33 $\pm$ 4.72	29.00 $\pm$ 4.58 *	34.33 $\pm$ 2.08 †	41.00 $\pm$ 3.00 ‡	39.33 $\pm$ 3.05 §
ALT (U/l)	34.33 $\pm$ 3.78	184.7 $\pm$ 26.63 *	146.0 $\pm$ 17.06 †	114.0 $\pm$ 7.0 ‡	89.33 $\pm$ 11.50 §
AST (U/l)	86.67 $\pm$ 7.76	248.3 $\pm$ 22.05 *	162.7 $\pm$ 7.37 †	140.7 $\pm$ 8.50 ‡	117.7 $\pm$ 15.63 §
ALP (U/l)	137 $\pm$ 2.64	282.7 $\pm$ 16.50 *	207.3 $\pm$ 12.34 †	190.3 $\pm$ 11.59 ‡	165 $\pm$ 7.81 §
کولیک اسید (μmol/mg)	74.96 $\pm$ 8.37	273.5 $\pm$ 30.24 *	190.4 $\pm$ 11.12 †	163.6 $\pm$ 8.25 ‡	115.7 $\pm$ 7.42 §
کینودنوکسی کولیک اسید (μmol/mg)	2.11 $\pm$ 0.58	6.30 $\pm$ 0.90 *	4.70 $\pm$ 0.54 †	3.76 $\pm$ 0.15 ‡	2.79 $\pm$ 0.28 §

علائم:

P < 0.05 نسبت به کنترل

P < 0.05 نسبت به NAFLD

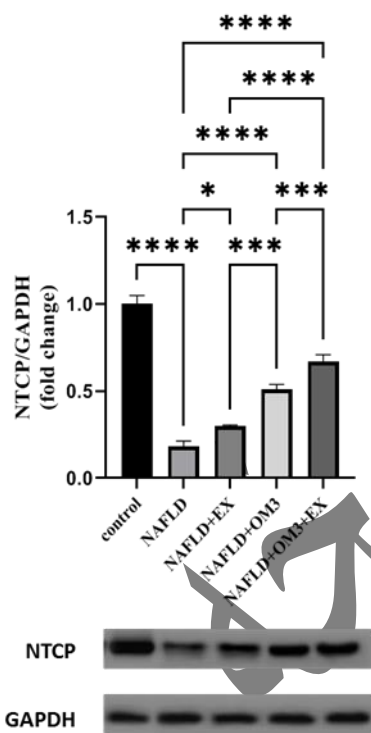
P < 0.05 نسبت به NAFLD + MICT

P < 0.05 نسبت به NAFLD + OM3

نتایج بیان ناقلین اسید های صفراوی در کبد

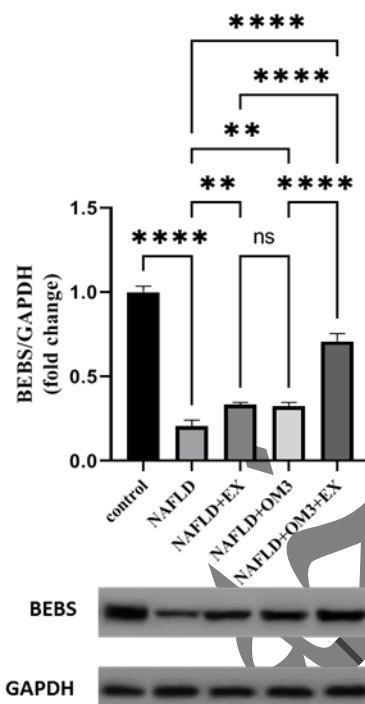
بیان ناقلین اسیدهای صفراوی در بافت کبد

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان پروتئین NTCP در بافت کبد موش‌های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($p < 0.0001$). تجویز مکمل امگا-۳ به تنهایی (گروه NAFLD+Om3) و همچنین ترکیب آن با تمرین تداومی (گروه NAFLD+Exe+Om3) منجر به افزایش معنی‌دار بیان پروتئین NTCP نسبت به گروه NAFLD گردید ($p = 0.00003$) و ($p = 0.00002$ ، به ترتیب). علاوه بر این، تمرین تداومی به مدت هشت هفته نیز بیان NTCP را در گروه NAFLD+Exe نسبت به گروه NAFLD به‌طور قابل توجهی افزایش داد ($p = 0.007$) (نمودار ۱).



نمودار ۱. میزان بیان پروتئین NTCP در بافت کبد (نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است؛ گروه‌ها شامل: کنترل سالم (Control)، کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)، کبد چرب با تمرین (NAFLD+Exe)، کبد چرب با مکمل امگا-۳ (NAFLD+Om3) و کبد چرب با تمرین و مکمل (NAFLD+Exe+Om3) می‌باشند. اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها با علامت‌های *، **، *** و **** به ترتیب با سطوح معنی‌داری $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.0001$ مشخص شده است.

بررسی بیان پروتئین BSEP در بافت کبد نشان داد که میزان بیان این پروتئین در گروه NAFLD نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری داشته است ($p < 0.0001$). تجویز مکمل امگا-۳ و تمرین تداومی به تنهایی موجب افزایش بیان BSEP در گروه‌های NAFLD+Om3 و NAFLD+Exe نسبت به گروه NAFLD گردید ($p = 0.018$ و $p = 0.025$ ، به ترتیب). ترکیب تمرین تداومی و مکمل امگا-۳ (گروه NAFLD+Exe+Om3) نیز بیشترین افزایش بیان BSEP را نسبت به گروه NAFLD ایجاد کرد ($p < 0.0001$) (نمودار ۲).



نمودار ۲. میزان بیان پروتئین BSEP در بافت کبد (نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است؛ در هر گروه. گروه‌ها مشابه توضیح نمودار ۱ هستند. سطوح معنی‌داری با علامت‌های *, **, ***, و **** به ترتیب نشان‌دهنده‌ی مقادیر $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ و $p < 0.0001$ می‌باشند.

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که القای بیماری کبد چرب غیرالکلی در موش‌های صحرایی موجب بروز تغییرات شدید هیستوپاتولوژیک در بافت کبد، از جمله دژنراسیون چربی (میکرو و ماکروواکوئلی)، هیپرتروفی سلول‌های کبدی، اختلال در آرایش طناب‌های هیپاتوسیستی، اتساع سینوزوئیدها و نفوذ گسترده سلول‌های التهابی گردید. این تغییرات نشان‌دهنده اختلال جدی در عملکرد کبد و آغاز پاسخ‌های التهابی مرتبط با تجمع بیش از حد لیپیدها است که از ویژگی‌های اصلی NAFLD محسوب می‌شود. ورزش مداومی با شدت متوسط و مکمل‌سازی امگا-۳ هر دو به طور مستقل موجب بهبود قابل توجهی در ساختار بافتی کبد شدند، به گونه‌ای که میزان تجمع چربی، التهاب و نکروز سلولی کاهش یافت. این نتایج با مطالعات پیشین هم‌خوانی دارد که نشان داده‌اند فعالیت بدنی منظم می‌تواند از طریق افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب، بهبود حساسیت به انسولین و کاهش استرس اکسیداتیو، آسیب‌های بافتی ناشی از NAFLD را کاهش دهد. از سوی دیگر، امگا-۳ با دارا بودن خاصیت ضدالتهابی و تنظیم بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم چربی، مانند $PPAR\alpha$ و $SREBP-1c$ ، نقش مهمی در کاهش تجمع چربی در کبد دارد. به نظر می‌رسد که اثر هم‌افزایی مشاهده‌شده در گروه ترکیبی MICT + امگا-۳ ناشی از تعامل مثبت بین اثرات فیزیولوژیکی ورزش و خواص ضدالتهابی و لیپوتروپیک امگا-۳ است. در این گروه، نه تنها پارامترهای بافتی کبدی بهبود یافت، بلکه پروفایل متابولیک و سطوح آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و ALP) نیز به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. کاهش هم‌زمان در گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول نشان می‌دهد که این مداخله دوگانه می‌تواند مسیرهای متابولیکی کلیدی در NAFLD را تنظیم کند.

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
یکی از یافته‌های قابل توجه مطالعه حاضر، تغییر بیان ناقلین اسیدهای صفراوی (NTCP و BSEP) در پاسخ به مداخلات بود. کاهش بیان این ناقلین در گروه NAFLD بیانگر اختلال در ورود و خروج اسیدهای صفراوی در هپاتوسیت‌هاست که می‌تواند باعث تجمع صفراوی و التهاب بافتی شود. در مقابل، تمرین تداومی و امگا-۳ موجب افزایش بیان NTCP و BSEP شدند که احتمالاً از طریق فعال‌سازی مسیر FXR/TGR5 و بهبود هموستاز اسیدهای صفراوی عمل کرده است. در گروه ترکیبی، افزایش هم‌زمان در بیان این ناقلین و کاهش سطح اسیدهای کولیک و CDCA در بافت کبد، بیانگر بازبانی نسبی تعادل صفراوی و عملکرد طبیعی کبد بود.

نتایج متناقضی در خصوص تأثیر ورزش و امگا ۳ بر فاکتورهای متابولیک منتشر شده است. در مطالعه‌ی مختاری و همکاران (۲۰۲۱)، هیچ تغییری در سطح آنزیم‌های کبدی ALT و AST پس از ۸ هفته تمرین مداوم (۵۴ دقیقه با سرعت ۲۰ متر در دقیقه) مشاهده نشد (۲۳). در مطالعه‌ی مشابه دیگری توسط میراحمد و همکاران (۲۰۱۶) تأثیر ورزش هوازی مداوم را به مدت هشت هفته در مردان مبتلا به NAFLD بررسی کردند و نتایج نشان داد که ورزش هوازی مداوم تأثیری بر شاخصهای متابولیک اصلی سرم شامل CHOL، HDL، TG، LDL نداشت. مطالعه‌ی سینی و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که در موش‌های مبتلا به NAFLD پس از هشت هفته تمرین هوازی مداوم (پنج جلسه دویدن روی تردمیل با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد VO2max در هفته) در مقایسه با موش‌های کنترل (سالم) سطح سرمی مایونکتین، انسولین، گلوکز و آنزیم‌های ALT و AST پایین‌تری داشتند (۲۴). شمس‌الدینی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که ورزش هوازی باعث بهبود قابل توجهی در سطح سرمی ALT و AST، مقاومت به انسولین و درصد چربی بدن در مردان مبتلا به بیماری کبد چرب غیرالکلی می‌شود (۲۵). برخلاف یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، دیوریز و همکاران (۲۰۰۸) اظهار داشتند که سطح ALT در مردان چاق تحت تأثیر ۱۲ هفته ورزش هوازی قرار نگرفته است. اگرچه مکانیسم‌های دقیق کاهش آنزیم‌های کبدی مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد که کاهش وزن و به ویژه کاهش درصد چربی بدن یک استراتژی مفید برای افزایش شاخص‌های آنزیم کبدی است (۲۶). مطالعه حاضر نشان داد که ورزش هوازی مداوم منجر به کاهش وزن در موش‌های مبتلا به NAFLD شده و احتمالاً این کاهش وزن باعث بهبود آنزیم‌های کبدی شده است.

مطالعه‌ای توسط خاقانی و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که گروهی از بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی دارای اضافه وزن که شش هفته تمرین هوازی مداوم (۲۰ دقیقه دویدن با شدت ۷۰ تا ۸۵ درصد حداکثر ضربان قلب) در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی سطح سرمی پایین‌تری از ALT، AST و ALP و پروفایل لیپیدی و درجه سونوگرافی کبد داشتند (۲۷). گیوه و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی، ورزش هوازی می‌تواند آنزیم‌های کبدی را کاهش دهد که مطابق با نتایج مطالعه‌ی حاضر است (۲۸).

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
 یافته‌های این تحقیق با یک متآنالیز اخیر انجام شده توسط تارق عزیز و همکارانش (۲۰۲۴) مطابقت دارد که کاهش سطح گاما گلوتامیل ترانسفراز و کاهش قابل توجه ALT و AST را پس از مکمل امگا ۳ نشان داد. در مقابل، پروفایل لیپیدی سرم در مدل‌های حیوانی به طور قابل توجهی بهبود یافت و کاهش قابل توجهی در AST، ALT و ALP و همچنین کاهش TG، LDL و Cho نشان داد (۲۲). در مطالعات متعدد نشان داده شده است که مکمل امگا ۳ به طور قابل توجهی پروفایل لیپیدی خون را بهبود می‌بخشد (۲۹، ۳۰).

متآنالیز لی و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که اسیدهای چرب چندغیراشباع امگا-۳ به طور قابل توجهی سطح پلاسمایی BMI، کلسترول تام (TC)، تری‌گلیسیرید (TG) و HDL در بیماران مبتلا به کبد چرب افزایش می‌یابد (۳۱). خورشیدی و همکاران (۲۰۲۳) متآنالیزی از ۱۴ مطالعه کارآزمایی بالینی انجام دادند که کاهش کلی قابل توجهی در سطح TG پس از مصرف مکمل‌های امگا ۳ نشان داد. با این حال، این اثر با ناهمگونی قابل توجهی همراه بود. بر اساس تجزیه و تحلیل زیرگروه‌ها، کاهش TG در افرادی که ۱۳ سال یا کمتر سن داشتند و افرادی که هیپرتری‌گلیسیریدمی داشتند، قابل توجه تر بود (۳۲).

تمرین ورزشی سازماندهی ساختاری سلول‌های کبدی را تغییر و بر مسیرهای دخیل در گلوکونئوژنز و متابولیسم لیپید تأثیر می‌گذارد. کاهش آنابولیسم چربی و افزایش کاتابولیسم چربی می‌تواند از عوامل مؤثر در بهبود فنوتیپ استئاتوز و کاهش محتوای لیپید کبد باشد. ورزش مداوم ممکن است محتوا یا عملکرد میتوکندری (افزایش فعالیت سیترات سنتاز، گیرنده هورمون تیروئید، سیتوکروم C اکسیداز و کارنتین پالمیتوئیل ترانسفراز) را بهبود ببخشد (۳۳). علاوه بر این، یکی از مکانیسم‌های بالقوه برای کاهش وزن بدن، چربی احشایی و چربی کبدی، افزایش استفاده از سوسترهای لیپیدی برای انرژی در طول استراحت یا ورزش است. سیگنالینگ انسولین و جذب گلوکز توسط تجمع لیپیدهای عضلانی درون سلولی در عضله اسکلتی دچار اختلال می‌شود. مقاومت به انسولین و هیپرانسولینمی جبرانی ناشی از این امر است که در نهایت باعث می‌شود کبد اسید چرب بیشتری دریافت کند. طبق یک مطالعه ورزش منظم در مدت زمان طولانی، حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشد که پیامدهایی برای هموستاز گلوکز دارد (۳۴). به عبارت دیگر، ورزش با افزایش توده عضلانی و افزایش میزان ناقل گلوکز (GLUT4) در داخل سلول‌های عضلانی، پاسخ به انسولین را افزایش می‌دهد.

تجمع تری‌گلیسیرید و به دنبال آن افزایش استرس اکسیداتیو، سیتوکین‌های التهابی و فیبروز کبدی، یکی از حل اصلی و مهم شروع و پیشرفت کبد چرب غیرالکلی است (۳۵). پروفایل نامناسب چربی خون، که شامل افزایش کلسترول تام و LDL و کاهش HDL می‌شود، یکی از عوامل خطر برای ایجاد NAFLD است و تجمع بافت چربی عامل مهمی در ایجاد آن است. بنابراین، یکی از اهداف درمانی این بیماری، اصلاح چربی خون از طریق روش‌های غیر دارویی است. فعالیت هوازی موثرترین روش غیر دارویی برای کاهش کلسترول تام خون و بهبود پروفایل چربی خون است. کلسترول تام خون را می‌توان با ورزش هوازی مداوم به طور مؤثر کاهش داد (۳۶).

¹ omega-3 polyunsaturated fatty acids

مطالعه حاضر نشان داد که اگرچه مکمل امگا ۳ و ورزش هوازی مداوم، چه به صورت جداگانه و چه به صورت ترکیبی، عوامل متابولیک، آنزیم‌های کبدی و سطح اسیدهای صفراوی را بهبود می‌بخشند، اما ترکیب ورزش مداوم و مکمل امگا ۳ منجر به کاهش چشمگیری در این پارامترها در مقایسه با هر یک از مداخلات به تنهایی شد.

نتایج آنالیز وسترن بلات نشان داد که در موش‌های مبتلا به NAFLD بیان پروتئین‌های NTCP و BSEP در بافت کبد نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود. مطابق با نتایج این مطالعه، تحقیقات اخیر نشان داده است که بیان YY1 در موش‌های چاق و بیماران NAFLD افزایش می‌یابد (۳۷). علاوه بر این، در مدل‌های حیوانی، YY1 از طریق یک فاکتور هسته‌ای کبدی دیگر به نام FXR باعث هیپاتواستاتوز و مقاومت به انسولین می‌شود. FXR به عنوان یک گیرنده هسته‌ای متابولیک که ابتدا به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی هموستاز کلسترول و اسیدهای صفراوی شناخته شد، به طور گسترده در کبد، روده و کلیه بیان می‌شود. علاوه بر این، FXR یک فاکتور رونویسی کلیدی در کنترل متابولیسم لیپید و گلوکز کبد مطابق با نتایج مطالعاتی حاضر، تحقیقات اخیر نشان داده است که بیان NTCP در بافت کبد با افزایش درجه NAFLD کاهش می‌یابد. FXR به عنوان مهمترین فاکتور رونویسی کنترل کننده رونویسی گیرنده‌ها و ناقلین اسیدهای صفراوی، با سرکوب رونویسی NTCP، جذب اسید صفراوی توسط کبد را مهار می‌کند (۳۸، ۳۹). تصور می‌شود مسیرهای FXR/SHP و FXR/FGF19/FGFR4 تنظیم‌کننده‌های منفی مهم سنتز اسیدهای صفراوی باشند (۳۴). مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه‌ای است که به بررسی تغییرات بیان ناقلین اسیدهای صفراوی NTCP و BSEP در بافت کبد مدل NAFLD متعاقب تمرین ورزشی و مصرف مکمل امگا ۳ می‌پردازد.

تغییرات در بیان گیرنده‌های اسید صفراوی مانند NTCP و BSEP نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های کبدی مانند NAFLD ایفا می‌کنند. NTCP یک ناقل مهم برای جذب اسیدهای صفراوی در هیپاتوسیت‌ها است، در حالی که BSEP مسئول ترشح اسیدهای صفراوی به داخل صفرا است. در مدل‌های حیوانی NAFLD، کاهش بیان این ناقلین صفراوی به تجمع اسیدهای صفراوی در کبد و افزایش التهاب و استرس اکسیداتیو منجر می‌شود، که از عوامل اصلی در پیشرفت بیماری‌های کبدی مانند NAFLD هستند.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که تغییرات در بیان این ناقلین در کبد تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند رژیم غذایی، سن و مداخلات دارویی قرار دارند. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای که توسط چنگ و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد، تأثیر کاهش یا افزایش در بیان NTCP و BSEP در مدل‌های مختلف بیماری کبدی بررسی شد و نشان داده شد که کاهش بیان این گیرنده‌ها می‌تواند به تجمع چربی و آسیب‌های بیشتر کبدی منجر شود (۴۰). در این راستا، مداخلات متابولیکی مانند تمرین ورزشی و مصرف مکمل‌های امگا-۳ به عنوان استراتژی‌های غیردارویی برای بهبود عملکرد کبد و تنظیم هموستاز اسید صفراوی مطرح شده‌اند. یافته‌های مطالعه ما نیز نشان داد که تمرین ورزشی تداومی (MICT) و مکمل‌سازی با امگا-۳ تأثیر قابل توجهی در بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد داشتند و سطح بیان NTCP و BSEP را به طور معنی‌داری افزایش دادند. به نظر می‌رسد این تغییرات از طریق تنظیم مسیرهای مولکولی مانند FXR و TGR5 تأثیرگذار باشند. چرا که در مطالعات

تأثیر تمرین و امگا ۳ بر ناقلین و اسیدهای صفراوی در کبد چرب
پیشین تأثیر ورزش و مصرف مکمل امگا ۳ بر تحریک این فاکتورها که مرتبط با رونویسی ناقلین مورد مطالعه هستند به اثبات رسیده است.
مسیر FXR به‌ویژه در تنظیم بیان NTCP و BSEP نقش حیاتی دارد و به‌نظر می‌رسد که فعالیت ورزشی و امگا-۳ از طریق فعال‌سازی این مسیر، باعث بهبود عملکرد این گیرنده‌ها در کبد می‌شود (۴۱). علاوه بر این، امگا-۳ به‌عنوان یک ماده ضدالتهابی شناخته شده است که می‌تواند بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم چربی را تعدیل کند و از طریق کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو، به بهبود عملکرد کبد و متابولیسم اسیدهای صفراوی کمک کند. ترکیب ورزش و امگا-۳ در این مطالعه نتایج بهتری نسبت به هر یک از این مداخلات به‌تنهایی نشان داد، که این امر تأکید بر اثرات هم‌افزایی این دو مداخله دارد.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه عدم استفاده از دارونما در گروه‌های بدون دریافت مکمل امگا-۳ بود. هرچند گروه‌های کنترل و NAFLD تحت شرایط یکسان نگهداری شدند، اما عدم گاوژ دارونما می‌تواند احتمال تأثیر عوامل مرتبط با فرایند گاوژ، مانند استرس مکانیکی یا پاسخ‌های فیزیولوژیک وابسته به آن را بر برخی متغیرهای مورد بررسی افزایش دهد. بنابراین، توصیه می‌شود در مطالعات آینده، به‌منظور کنترل اثرات احتمالی گاوژ، گروه‌های کنترل و تمرین نیز دارونمای مناسب دریافت کنند.

به‌طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که تغییرات در بیان ناقلین اسید صفراوی NTCP و BSEP نقش مهمی در پیشرفت NAFLD دارند و مداخلات غیردارویی مانند ورزش و مکمل‌سازی امگا-۳ می‌توانند از طریق تغییر بیان این گیرنده‌ها یا مسیرهای مولکولی مرتبط، به بهبود عملکرد کبد و متابولیسم اسیدهای صفراوی کمک کنند. این نتایج می‌توانند به عنوان مبنای تحقیقات آینده در زمینه بهبود استراتژی‌های درمانی و پیشگیری از NAFLD در نظر گرفته شوند.

تمام آزمایش‌های حیوانی مطابق با دستورالعمل اروپایی ۲۰۱۰/۶۳/EU در مورد حفاظت از حیوانات مورد استفاده برای اهداف علمی و دستورالعمل‌های موسسه ملی بهداشت ایالات متحده برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (نشریه NIH شماره ۷۸-۲۳، اصلاح شده در سال ۱۹۷۸)، با رویه‌های مصوب هیئت بررسی اخلاقی نهادی مربوطه انجام شد. این تحقیق با کد اخلاق IR.SCU.REC.1404.069 در کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز مصوب گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از رساله مقطع دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی در دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز می‌باشد و با حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسید. بدین وسیله از زحمات اساتید و تمام کسانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

همه نویسندگان تأیید کردند که هیچ تضاد منافی در این مطالعه وجود ندارد.

بیانیه در دسترس بودن داده‌ها

داده‌های پشتیبان یافته‌های این مطالعه بنا به درخواست در دسترس هستند.

منابع

1. Kokkorakis M, Boutari C, Katsiki N, Mantzoros CS. From non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) to steatotic liver disease (SLD): an ongoing journey towards refining the terminology for this prevalent metabolic condition and unmet clinical need. *Metabolism Clin Exp*. 2023;147:155-162.
2. Le MH, Yeo YH, Zou B, Barnet S, Henry L, Cheung R, et al. Forecasted 2040 global prevalence of nonalcoholic fatty liver disease using hierarchical Bayesian approach. *Clin Mol Hepatol*. 2022;28(4):841-852.
3. Teng ML, Ng CH, Huang DQ, Chan KE, Tan DJ, Lim WH, et al. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2023;29(Suppl):S32-S40.
4. Rinaldi L, Pafundi PC. Mechanisms of non-alcoholic fatty liver disease in the metabolic syndrome: a narrative review. *J Metab Syndr*. 2021;10(2):45-53.
5. Bansal S, Vachher M, Arora T, Kumar B, Burman A. Visceral fat: a key mediator of NAFLD development and progression. *Hum Nutr Metab*. 2023;33:200210.
6. Wang YD, Chen WD, Yu D, Forman BM, Huang W. The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing NF- κ B in mice. *Hepatology*. 2011;54:1421-1432. doi:10.1002/hep.24525
7. Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, Arrese M, Trauner M. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology*. 2017;65:350-362. doi:10.1002/hep.28709
8. Fleishman JS, Kumar S. Bile acid metabolism and signaling in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9:97.
9. Wang Y, et al. Dysregulated bile acid homeostasis: unveiling its role in metabolic diseases. *Med Rev*. 2024;4(4):262-283.
10. Chavez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2017;152:1679-1694.e3. doi:10.1053/j.gastro.2017.01.055
11. Fiorucci S, Distrutti E, Carino A, Zampella A, Biagioli M. Bile acids and their receptors in metabolic disorders. *Prog Lipid Res*. 2021;82:101094. doi:10.1016/j.plipres.2021.101094

12. Jiménez-Maldonado A, García-Suárez PC, Rentería I, Moncada-Jiménez J, Plaisance EP. Impact of high-intensity interval training and sprint interval training on peripheral markers of glycemic control in metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(8):165820.
13. Shi J, Cui J, Zheng T, Han X, Wang B, Wang W, et al. Comparative effects of aerobic and resistance exercise on bile acid profiles and liver function in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2025;25:239.
14. Lu W, Li S, Li J, Wang J, Zhang R, Zhou Y, et al. Effects of omega-3 fatty acid in nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:1459790.
15. Hishikawa D, Yanagida K, Nagata K, Kanatani A, Iizuka Y, Hamano F, et al. Hepatic levels of DHA-containing phospholipids instruct SREBP1-mediated synthesis and systemic delivery of polyunsaturated fatty acids. *iScience.* 2020;23:101517.
16. Chen CC, Ho CY, Chaung HC, Tain YL, Hsieh CS, Kuo FY, et al. Fish omega-3 fatty acids induce liver fibrosis in the treatment of bile duct-ligated rats. *Dig Dis Sci.* 2013;58:440-447.
17. Lee S, Kim S, Le HD, Meisel J, Strijbosch RA, Nose V, et al. Reduction of hepatocellular injury after common bile duct ligation using omega-3 fatty acids. *J Pediatr Surg.* 2008;43(11):2010-2015.
18. Cieslak A, Trottier J, Verreault M, Milkiewicz P, Vohl MC, Barbier O. N-3 polyunsaturated fatty acids stimulate bile acid detoxification in human cell models. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018:6031074.
19. Picchi MG, Mattos AM, Barbosa MR, Duarte CP, Gandini MA, Portari GV, et al. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta Cir Bras.* 2011;26:25-30.
20. Keating SE, Johnson NA, Mielke GI, Coombes JS. A systematic review and meta-analysis of interval training versus moderate-intensity continuous training on body adiposity. *Obes Rev.* 2017;18(8):943-964.
21. Khadke S, Mandave P, Kuvalekar A, Pandit V, Karandikar M, Mantri N. Synergistic effect of omega-3 fatty acids and oral-hypoglycemic drug on lipid normalization through modulation of hepatic gene expression in high fat diet with low streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrients.* 2020;12(12):3652.
22. Hristu R, Stanciu SG, Dumitru A, Paun B, Floroiu I, Costache M, et al. Influence of hematoxylin and eosin staining on the quantitative analysis of second harmonic generation imaging of fixed tissue sections. *Biomed Opt Express.* 2021;12(9):5829-5843.
23. Mokhtari F, Talebi Garakani E, Nasiri K, Akbari A. Effect of silymarin supplementation and continuous and high intensity interval training on liver enzymes and histological modifications in rats with dexamethasone-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism Exerc.* 2021;11(1):19-35.
24. Sini ZK, Afzalpour ME, Ahmadi MM, Sardar MA, Khaleghzadeh H, Gorgani-Firuzjaee S, et al. Comparison of the effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on indices of liver and muscle tissue in high-fat diet-induced male rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Egypt Liver J.* 2022;12(1):63.
25. Shamsoddini A, Sobhani V, Ghamar Chehreh ME, Alavian SM, Zaree A. Effect of aerobic and resistance exercise training on liver enzymes and hepatic fat in Iranian men with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepat Mon.* 2015;15(10):e31434.
26. Devries MC, Samjoo IA, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. Effect of endurance exercise on hepatic lipid content, enzymes, and adiposity in men and women. *Obesity.* 2008;16(10):2281-2288.

27. Tondpa Khaghani B, Dehkhoda MR, Amani Shalamzari S. Improvement of aerobic power and health status in overweight patients with non-alcoholic fatty liver disease with high intensity interval training. *Payavard Salamat*. 2019;13(1):71-80.
28. Guo R, Liong EC, So KF, Fung ML, Tipoe GL. Beneficial mechanisms of aerobic exercise on hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015;14(2):139-144.
29. Huang WC, Xu JW, Li S, Ng XE, Tung YT. Effects of exercise on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and lipid metabolism in ApoE knockout mice. *Nutr Metab*. 2022;19(1):10.
30. Muscella A, Stefàno E, Marsigliante S. The effects of exercise training on lipid metabolism and coronary heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020;319(1):H76-H88.
31. Lee CH, Fu Y, Yang SJ, Chi CC. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on non-alcoholic fatty liver: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2020;12(9):2769.
32. Khorshidi M, Hazaveh ZS, Alimohammadi-Kamalabadi M, Jamshidi S, Moghaddam OM, Olang B, et al. Effect of omega-3 supplementation on lipid profile in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr J*. 2023;22(1):9.
33. Trefts E, Williams AS, Wasserman DH. Exercise and the regulation of hepatic metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:203-225.
34. Zhao X, An X, Yang C, Sun W, Ji H, Lian F. The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. *Front Endocrinol*. 2023;14:1149239.
35. Mann S, Beedie C, Jimenez A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. *Sports Med*. 2014;44:211-221.
36. Lu Y, Ma Z, Zhang Z, Xiong X, Wang X, Zhang H, et al. Yin Yang 1 promotes hepatic steatosis through repression of farnesoid X receptor in obese mice. *Gut*. 2014;63(1):170-178.
37. Chiang JY, Ferrell JM. Discovery of farnesoid X receptor and its role in bile acid metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 2022;548:111618.
38. Aguilar-Olivos NE, Carrillo-Córdova D, Oria-Hernández J, Sánchez-Valle V, Ponciano-Rodríguez G, Ramírez-Jaramillo M, et al. The nuclear receptor FXR, but not LXR, up-regulates bile acid transporter expression in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2015;14(4):487-493.
39. Cheng X, Buckley D, Klaassen CD. Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(11):1665-1676.
40. Jiao TY, Ma YD, Guo XZ, Ye YF, Xie C. Bile acid and receptors: biology and drug discovery for nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43(5):1103-1119.
41. Ha SG, Park JH, Kim MY, Lee SJV. Brief guide to western blot assays. *Mol Cells*. 2025;100297.
42. Zhao X, An X, Yang C, Sun W, Ji H, Lian F. The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. *Front Endocrinol*. 2023;14:1149239.