

اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن کاتپسین بی (CTSB) و کاتپسین ال (CTSL) در بافت چربی موش‌های دارای رژیم غذایی پرچرب

دکتر سعید دانش‌یار^۱، دکتر سعید شوکتی بصیر^۲، دکتر فاطمه جلالی مقیم^۳

۱) گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت اله العظمی بروجردی (ره)، لرستان ایران، ۲) گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران، ۳) گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: لرستان، بروجرد، دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره)، دانشکده علوم انسانی، کدپستی: ۶۹۱۹۹- e-mail: s.daneshyar@yahoo.com و s.daneshyar@abru.ac.ir :۶۹۷۳۷

چکیده

مقدمه: مصرف غذای پرچرب، با تغییرات میزان پروتئازهای لیزوزومی، از جمله کاتپسین بی (CTSB) و ال (CTSL)، همراه است که می‌تواند موجب اختلال در متابولیسم چربی‌ها و چاقی شود. در این مطالعه، اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های CTSB و CTSL در بافت چربی موش‌هایی که دارای رژیم غذایی پرچرب بودند، بررسی شد. مواد و روش‌ها: ۲۱ سر موش سوری نر (سن چهار هفته با وزن ۱۲ گرم) در سه گروه؛ کنترل (۷ سر)، غذای پرچرب (۷ سر) و تمرین استقامتی-غذای پرچرب (۷ سر) جای گرفتند. موش‌های گروه غذای پرچرب، به مدت ۱۲ هفته با غذای پرچرب (۴۲ درصد چربی) تغذیه شدند. موش‌های گروه تمرین-غذای پرچرب، علاوه بر مصرف غذای پرچرب، به مدت شش هفته (هفته‌ای پنج جلسه) تحت تمرین استقامتی تداومی بر روی نوآرگردان با شدت و حجم فزاینده قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های CTSB و CTSL از روش Real Time PCR استفاده شد. یافته‌ها: غذای پرچرب تجویز شده اثر چاق‌کنندگی داشت ($P=0/001$). بیان ژن CTSL در گروه‌های مورد پژوهش تغییر نکرد ($P=0/118$). با این حال، بیان ژن CTSB در بافت چربی گروه غذای پرچرب، پنج برابر افزایش یافت ($P=0/0015$). میزان افزایش CTSB در گروه تمرین-غذای پرچرب، ۵۰ درصد کمتر از گروه غذای پرچرب بود ($P=0/013$). نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی تا حدی می‌تواند از افزایش بیان CTBP ناشی از غذای پرچرب ممانعت کند. به نظر می‌رسد، بخشی از اثر پیشگیری‌کننده تمرین استقامتی از عوارض مربوط به چاقی احتمالاً از طریق مهار افزایش بیان CTSB در بافت چربی حاصل می‌شود.

واژگان کلیدی: چاقی، لیزوزوم، اتوفاژی، مقاومت انسولینی

دریافت مقاله: ۹۹/۴/۲ - دریافت اصلاحیه: ۹۹/۱۰/۲۰ - پذیرش مقاله: ۹۹/۱۰/۲۰

مقدمه

چاقی اختلال متابولیکی است که از طریق افزایش التهاب و مقاومت انسولینی با عارضه‌های دیابت نوع دو، کبدچرب، چربی خون بالا، افزایش فشار خون و بیماری‌های قلبی-عروقی همراه می‌شود.^۱ سبک زندگی امروزی که مشتمل بر رژیم غذایی پرچرب و بی‌حرکی است، روند شیوع اضافه وزن و چاقی را به سوی همه‌گیری سوق داده است.^۲ تجمع بیش از اندازه چربی که در شرایط چاقی ایجاد می‌شود، با اختلال عملکرد بافت چربی همراه می‌شود^{۳،۴} که از طریق سازوکارهای مختلفی موجب بروز و تشدید عوارض

مرتبط با چاقی می‌شود.^۵ مطالعات نشان داده‌اند، عملکرد لیزوزوم در سلول‌های چربی موش‌هایی که بر اثر مصرف غذای پرچرب، چاق شده بودند و همچنین در آزمودنی انسانی چاق، دچار اختلال می‌شود.^{۶،۷} کاتپسین‌ها^۸ به عنوان عضوی از خانواده پروتئازهای لیزوزومی در هموستاز سلولی نقش کلیدی ایفا می‌کنند.^{۸،۹} کاتپسین ال (CTSL) و کاتپسین بی (CTSB)، ایزوform‌های مهم کاتپسین‌های لیزوزوم هستند که در همه سلول‌های بدن

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.4.4.7]

بیست و چهار ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از یک شب ناشتایی، موش‌ها از طریق تزریق درون صفاقی کتامین (۲۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند^{۲۸} و چربی احشائی ناحیه‌ی اپیدیدیمالⁱⁱⁱ آن‌ها برداشته و فریز (۸۰- سانتی‌گراد) شدند.

برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های CTSB و CTSL از روش Real-Time RT-PCR استفاده شد، که در ذیل جزئیات آن ذکر شده است. ابتدا، توالی پرایمر ژن‌های CTSB و CTSL و ژن GAPDH (به عنوان مرجع) از مطالعات گذشته اخذ شد.^{۲۹-۳۱} سپس ویژگی و کیفیت پرایمر توسط سایت پرایمر بلست (*primer-blast/NCBI*) و امکان تشکیل ساختارهای دوتایی و سنجاق سر توسط نرم‌افزار اولیگوآنالیزور (*Oligo Analyzer - 1.0.2*) مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. مشخصات پرایمرهای سنتز شده در جدول ۲ ذکر شده است.

RNA بافت چربی طبق دستورالعمل کیت ترایزول (*Thermo Scientific*) استخراج شد. به‌طور خلاصه: ۵۰ میلی‌گرم از نمونه بافت چربی، پس از افزودن یک میلی‌لیتر محلول ترایزول، از طریق دستگاه هم‌زن هم‌وژن شد. بافت هم‌وژن شده در دوره‌های متفاوت سانتریفوژ شد که محصول آن تشکیل رسوب حاوی RNA بود که پس از اضافه کردن آب دیس (*Thermo Scientific*) به مدت ۱۰ دقیقه درون دستگاه ترموبلاک (*KiagenTech, Canada*) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد. پس از استخراج، خلوص (در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر) و غلظت (در طول موج ۲۶۰ نانومتر) RNA استخراج شده توسط دستگاه طیف‌سنجی نور (*Pharmacia Biotech Ultrospec 3000*) از طریق فرایند جذب نوری (OD) تعیین شد. خلوص بیشتر از ۱/۶ مورد قبول واقع شد. RNA استخراج شده، به روش رونویسی معکوس، توسط دستورالعمل کیت سنتز cDNA (*Thermo Scientific*) به DNAی مکمل تبدیل شد. در طی این مرحله، هگزامرتصادفی (*Random Hexamer*)، مهار کننده RNAase، آنزیم رونویسی معکوس (*Revert Aid*)، و بازهای سازنده DNA (*dNTPs*) به کار گرفته شد.

غذای پرچرب شامل ۴۲ درصد چربی (کیلوکالری)، ۴۰ درصد کربوهیدرات (کیلوکالری) و ۱۸ درصد پروتئین (کیلوکالری) بود. قرص‌های غذایی توسط شرکت دام‌طیور ساخته شد. موش‌های گروه کنترل با غذای استاندارد موش-ها تغذیه شدند که شامل ۱۵ درصد چربی (کیلوکالری)، ۲۵ درصد پروتئین (کیلوکالری) و ۶۰ درصد کربوهیدرات (کیلوکالری) بود.

موش‌های گروه تمرین-غذای پرچرب، علاوه بر مصرف غذای پرچرب که در پاراگراف قبل توضیح داده شد، به مدت شش هفته از سن ۱۱ تا سن ۱۷ هفته، در فاز شبانه (شش‌الی هشت بعدازظهر) تحت تمرین استقامتی قرار گرفتند.^{۳۰} تمرین استقامتی تجویز شده در برگیرنده‌ی دویدن تداومی بر روی نوارگردان ویژه موش (شرکت پیشرو اندیشه صنعت-ساخت ایران) با شیب صفر درجه، به مدت شش هفته بود.^{۳۰}

این پروتکل تمرینی بر اساس افزایش تدریجی بارکاری شامل شدت (سرعت) و حجم تمرین (مدت هر جلسه) طراحی شد.^{۳۶،۳۷} همان‌طور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، موش‌ها در هفته اول با سرعت ۱۴ متر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در هفته ششم با سرعت ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه دویدند. موش‌های گروه کنترل، بدون اعمال هیچ نوع تمرین ورزشی در قفس‌های خود قرار داشتند.

جدول ۱- برنامه تمرین استقامتی بر روی نوارگردان

سرعت (متر بر دقیقه)	مدت (دقیقه)	تعداد جلسه تمرین در هفته	
۱۴	۱۵	۴	هفته‌ی اول
۱۵	۲۰	۵	هفته‌ی دو
۱۶	۲۵	۵	هفته‌ی سوم
۱۷	۲۵	۵	هفته‌ی چهارم
۱۸	۲۵	۵	هفته‌ی پنجم
۲۰	۳۰	۵	هفته‌ی ششم

شیب نوارگردان صفر درجه است

وزن موش‌ها به صورت هفتگی در طول دوره‌ی پژوهش از طریق ترازوی دیجیتالی با حساسیت ۰/۰۰۱ (انتریس ۳۲۰۲- شرکت آرتوریس- آلمان)ⁱⁱ اندازه‌گیری شد که میزان آن در سه نقطه زمانی یعنی شروع مداخله غذای پرچرب، شروع مداخله تمرین استقامتی و پایان مداخلات گزارش شد.

i -Chow

ii -ENTRIS 3202-1S S, Artorius, Germany

iii -Epidydimal

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای ژن‌های مورد پژوهش

نام ژن	شماره (Accession)	توالی رفت (Forward)'	توالی معکوس (Reverse)	طول قطعه محصول (product length)	منبع
کاتپسین بی (Ctsb)	NM_007798	AGACCTGCTTACTTGCTGTG دمای ذوب (Tm): ۵۷/۸۲ محتوای GC: ۵۰ درصد	GGAGGGATGGTGTATGGTAAG دمای ذوب (Tm): ۵۷/۲۳ محتوای GC: ۵۲ درصد	۱۵۰	۲۷
کاتپسین ال (CtsL)	NM_009984	GTGGACTGTTCTCACGCTCA دمای ذوب (Tm): ۵۹/۹۷ محتوای GC: ۵۵ درصد	TATCCACGAACCCTGTGTCA دمای ذوب (Tm): ۵۸/۳۷ محتوای GC: ۵۰ درصد	۱۸۴	۲۸
ژن کنترل (Gapdh)	NM_001289726	ACAGTCCATGCCATCACTGCC دمای ذوب (Tm): ۶۳ محتوای GC: ۵۷ درصد	GCCTGCTTCACCACCTTCTTG دمای ذوب (Tm): ۶۲ محتوای GC: ۵۷ درصد	۲۶۶	۲۹

$$\text{Fold Change} = \frac{E_{\text{Tar.}}^{\Delta\text{Cp}(\text{Con-treat.})}}{E_{\text{Ref.}}^{\Delta\text{Cp}(\text{Con-treat.})}}$$

- E_{tar} : کارایی PCR مربوط به تکثیر قطعات ژن هدف (Ctsb, CtsL)
- E_{ref} : کارایی PCR مربوط به تکثیر قطعات ژن کنترل (GAPDH)
- $\Delta\text{Cp}_{\text{tar}}(\text{con-treat})$: اختلاف نقطه تقاطع (یا ct) بین ژن هدف (Ctsb, CtsL) در گروه تحت مداخله و گروه کنترل
- $\Delta\text{Cp}_{\text{ref}}(\text{con-treat})$: اختلاف نقطه تقاطع (یا ct) بین ژن مرجع (GAPDH) در گروه تحت مداخله و گروه کنترل

تجزیه و تحلیل آماری

برای محاسبه تعداد آزمودنی‌های پژوهشⁱ از نرم‌افزار *G Power* نسخه ۳،۱،۹،۲ استفاده شد. بر اساس توان مطالعه ۸۰ درصد، خطای آلفای ۰/۰۵ و اندازه اثر استاندارد ۰/۱، حجم نمونه هر گروه به مقدار ۶/۲ به دست آمد. از این رو، تعداد هفت نمونه برای هر گروه در نظر گرفته شد. به منظور تحلیل آماری داده‌های پژوهش و ترسیم نمودار از نرم‌افزار گراف پدⁱⁱ نسخه ۸،۴،۳ استفاده شد. از آزمون شاپیرو-ویلکⁱⁱⁱ، برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. تساوی واریانس گروه‌ها از طریق آزمون برون^{iv} مورد بررسی قرار گرفت. از تحلیل واریانس یک طرفه^v به همراه آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل داده‌های مربوط به وزن و بیان ژن‌های CTSB و CTSL در گروه‌های مورد پژوهش

برای انجام واکنش Real Time-PCR از کیت سایبر پریمکس (*SYBR®Premix Ex Tag TM; TaKaRa, Japan*) استفاده شد. واکنش‌ها به صورت دوتایی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط واکنش شامل سه میکرولیتر cDNA (۱۰ درصد)، نیم میکرولیتر پرایمر رفت (غلظت ۱۰ پیکومول) و نیم میکرولیتر پرایمر معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۰ میکرولیتر سایبرپریمیکس، نیم میکرولیتر رنگ مرجع روکس و آب مقطر بود. تکثیر و پایش از طریق دستگاه کوربت (*RG-6000, Corbett, Australia*)، با برنامه زمانی ذیل صورت گرفت.

مرحله اول) واسرشت سازی اولیه: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد. مرحله دوم) واسرشت-اتصال-گسترش: ۴۰ چرخه دو مرحله‌ای: ۱- ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ ۲- ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ژنی Ctsb: ۳۳ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ژنی CtsL: ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ژن GAPDH. مرحله سوم) به منظور ترسیم دمای ذوب، یک برنامه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد در انتها پروتکل انجام شد.

به منظور کمی‌سازی میزان بیان ژن، در ابتدا کارایی پرایمرها و PCR (*PCR Efficiency*) توسط نرم افزار *LinRegPCR* به صورت مجزا محاسبه شد. منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌هایی که نمودار آن‌ها منطبق با الگو نبود، کنار گذاشته شدند. با کمک نرم‌افزار جن-ایکس (*Genex16.1*)، بیان نسبی ژن با معیار چندبرابر (*Fold Change*) بر اساس معادله ذیل (معروف به *Pfaffl*)^{۲۲} محاسبه شد.

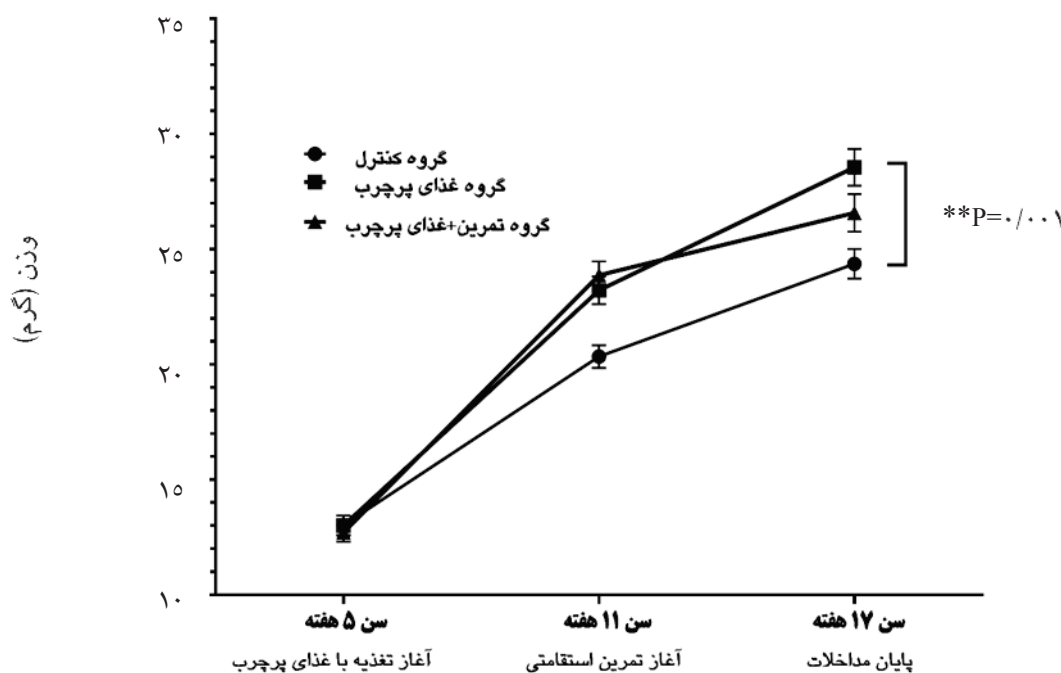
i -Sample size
ii -GraphPad Prism
iii -Shapiro-Wilk
iv -Brown-Forsythe test
v -One Way ANOVA

استفاده شد. سطح معنی‌داری برای آزمون‌های آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس آزمون شاپیرو-ویلک مشخص گردید که داده‌های مربوط به متغیر وزن ($P=0/232$) و داده‌های مربوط به متغیرهای CTSL ($P=0/145$) و CTSL ($P=0/279$) در گروه‌های مورد پژوهش، دارای توزیع نرمال هستند. همچنین، نتایج آزمون برون نشان داد، متغیرهای وزن ($P=0/398$)، CTSL ($P=0/290$) و CTSL ($P=0/180$) در گروه‌های مورد پژوهش دارای واریانس برابر هستند.

میانگین وزن گروه‌های مورد پژوهش طی پروتکل مداخله در نمودار ۱ توصیف شده است. میانگین وزن گروه‌های

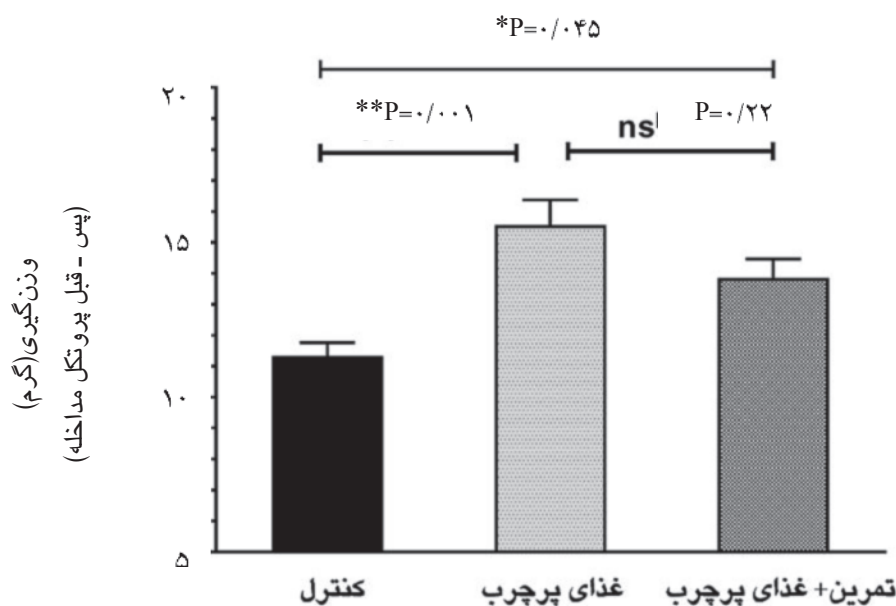


نمودار ۱- میانگین وزن گروه‌های مورد پژوهش طی پروتکل مداخله

داده‌های نمودار به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ارائه شده‌اند. * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است.

وزن‌گیری گروه غذای پرچرب نسبت به گروه کنترل، $4/24$ گرم معادل با 33 درصد بیشتر بود ($P=0/001$). مقدار وزن‌گیری گروه تمرین-غذای پرچرب در مقایسه با گروه کنترل، $2/53$ گرم معادل با 22 درصد بیشتر بود ($P=0/041$). همچنین مقدار وزن‌گیری گروه تمرین-غذای پرچرب در مقایسه با غذای پرچرب، $1/71$ گرم معادل با 10 درصد کمتر (غیر معنی‌دار) بود ($P=0/22$).

برای ارزیابی بیشتر، مقدار وزن‌گیری (افزایش وزن)^۱ یعنی کسر وزن پایان پروتکل مداخله از وزن قبل پروتکل مداخله، مورد بررسی قرار گرفت که در نمودار ۲ قابل مشاهده است. به طور خلاصه، مقدار وزن‌گیری گروه کنترل، گروه غذای پرچرب و گروه تمرین-غذای پرچرب، به ترتیب $11/32$ ، $15/57$ ، $13/85$ گرم بود. در رویکرد مقایسه، مقدار

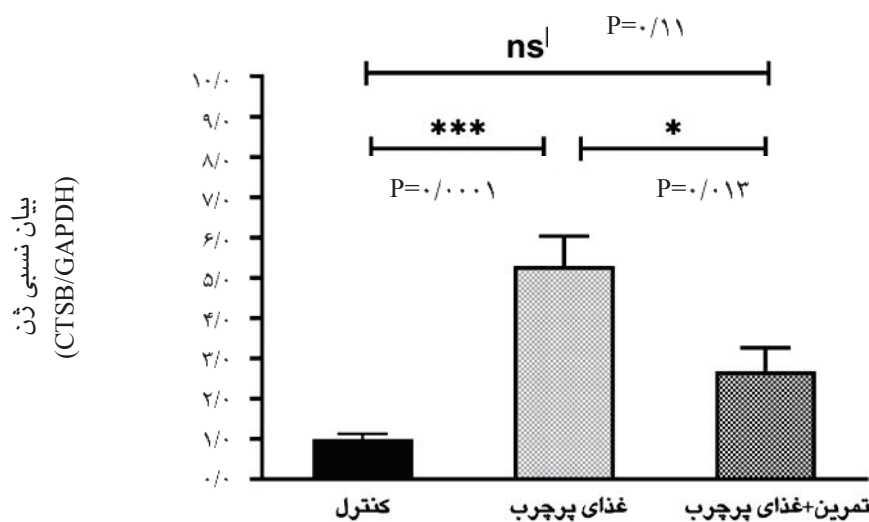


نمودار ۲- مقایسه مقدار وزن‌گیری گروه‌های مورد پژوهش

داده‌های نمودار به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ارائه شده‌اند. * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف و ns به معنی عدم معنی‌دار بودن اختلاف است. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است.

پرچرب، ۴۹ درصد کمتر بود ($P=0.013$). به عبارت بهتر، بر اثر غذای پرچرب، بیان ژن CTSB افزایش زیادی یافت و تمرین ورزشی تا حدی از این افزایش جلوگیری کرد.

همان‌گونه که نمودار ۳ نشان داده شده است، بیان نسبی ژن CTSB در گروه غذای پرچرب در مقیاسه با گروه کنترل ۵/۳ برابر بیشتر بود ($P=0.001$). هم‌چنین، بیان نسبی این ژن در گروه تمرینی - غذای چرب در قیاس با گروه غذای

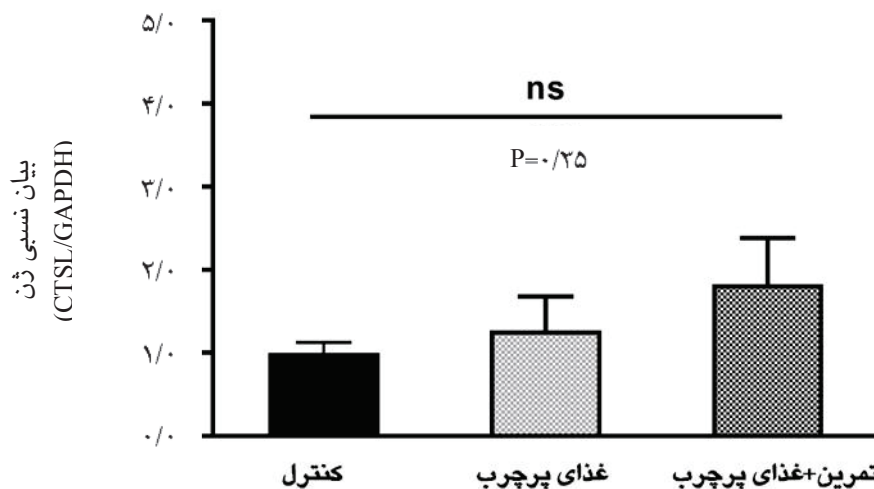


نمودار ۳- بیان نسبی ژن کاتپسین بی (CTSB) در گروه‌های مورد پژوهش

داده‌های نمودار به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ارائه شده‌اند. بیان نسبی ژن با معیار چند برابر (Fold change) نسبت به ژن کنترل GAPDH تعیین شده است. * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف و ns به معنی عدم معنی‌دار بودن اختلاف است. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است.

دیگر، غذای پرچرب و تمرین ورزشی تغییر معنی‌داری در بیان ژن CTSL ایجاد نکرد (نمودار ۴).

بیان نسبی ژن CTSL در گروه‌های مورد پژوهش اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت ($p=0/35$). به عبارت



نمودار ۴- بیان نسبی ژن کاتپسین ال (CTSL) در گروه‌های مورد پژوهش

داده‌های نمودار به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ارائه شده‌اند. بیان نسبی ژن با معیار چند برابر (Fold change) نسبت به ژن کنترل GAPDH تعیین شده است. ns به معنای عدم معنی‌دار اختلاف بین گروه‌ها است. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است.

بحث

علاوه بر مصرف غذای پرچرب، تمرین استقامتی انجام داده بودند، دچار چاقی نشدند. این یافته می‌تواند دلالت بر این داشته باشد که تمرین استقامتی از بروز چاقی ناشی از مصرف غذای پرچرب ممانعت کرده است.

شاخص رایجی که برای احراز چاقی در موش‌ها استفاده می‌شود، شاخص لیⁱⁱ است. در محاسبه ی شاخص لی، چاقی بر اساس وزن و قد (از پوزه تا ابتدای دم) برآورد می‌شود.^{۲۴} با این حال، این شاخص بر روی موش‌های صحرایی (رت) آزمایش و مورد تایید قرار گرفته است.^{۲۳} همچنین، بر اساس جستجوهای انجام شده، اغلب مطالعاتی که از موش‌های سوری به عنوان آزمودنی بهره می‌گیرند، از شاخص لی به منظور برآورد ترکیب بدنی استفاده نکرده‌اند.^{۲۵-۲۷} بر همین اساس، در مطالعه حاضر از این شاخص استفاده نشد.

مطالعات گذشته، افزایش بیان و افزایش فعالیت آنزیمی CTSE را در بافت چربی احشائی موش‌های چاق ناشی از غذای پرچرب گزارش نموده‌اند.^{۷،۱۲-۱۴} مطابق با یافته‌های مطالعات گذشته، در این پژوهش، افزایش بیان CTSE در بافت چربی گروه غذای پرچرب که دچار چاقی شدند، مشاهده شد. به نظر می‌رسد که سازوکار زیربنای افزایش بیان CTSE ناشی از تغذیه پرچرب مربوط به شرایط التهابی است که بر اثر افزایش چربی بدن بروز می‌یابد.^{۱۳}

یافته‌های این پژوهش نشان داد، تغذیه با غذای پرچرب موجب بروز چاقی در موش‌ها و افزایش بیان نسبی ژن CTSE گردید ولی تغییر معنی‌داری در بیان ژن CTSL ایجاد نکرد. همچنین، تمرین استقامتی از افزایش بیان CTSE در موش‌هایی که دارای رژیم غذایی پرچرب بودند، تا حدی ممانعت کرد، لیکن تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن CTSL ایجاد نکرد.

نتایج این پژوهش نشان داد، میانگین وزن موش‌هایی که رژیم غذایی پرچرب داشتند، در قیاس با گروه کنترل، ۱۷ درصد (معنی‌دار) افزایش یافت. با این حال، مقدار افزایش وزن موش‌هایی که علاوه بر داشتن رژیم غذایی پرچرب، تمرین استقامتی داشتند، نه درصد (غیر معنی‌دار) افزایش یافت. هاریر و تایباتⁱ (سال ۲۰۱۰) در مطالعه مروری با موضوع چاقی ناشی از غذای پرچرب در مدل‌های موش، افزایش وزن ۱۰ الی ۲۵ درصد را به عنوان چاقی متوسط تلقی کرده‌اند.^{۳۳} بر اساس این معیار می‌توان بیان داشت که موش‌هایی که صرفاً غذای پرچرب مصرف کرده بودند، دچار چاقی شده‌اند که دلالت بر اثر چاق‌کنندگی غذای پرچرب تجویز شده دارد. همچنین، می‌توان بیان داشت، گروهی که

ii -Lee index

i -Hariri and Louise Thibault

مطالعات نشان داده‌اند که التهاب و مقاومت انسولینی ناشی از چاقی از طریق سازوکار CTSB میانجی‌گری می‌شود. با هاپیرتروفی سلول‌های چربی ناشی از چاقی، نفوذپذیری لیزوزوم‌ها در سلول افزایش می‌یابد که موجب نشت CTSB از لیزوزوم به دورن سیتوزول می‌شود که از طریق اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش تولید گونه‌های اکسیژنی فعال موجب مرگ سلول‌های چربی و ایجاد ساختار تاجی شکل در بافت چربی می‌شود.^{۷۱۲} به علاوه CTSB از طریق فراخوانی ماکروفاژها به بافت چربی موجب افزایش سایتوکائین‌های پیش التهابی و در نتیجه بروز یا تشدید التهاب می‌شود.^{۶۷،۱۲،۳۸،۳۹} از طرف دیگر، نشان داده شده است، عوامل پیش التهابی بیان CTSB را در بافت چربی القا می‌کند.^{۱۳} به این ترتیب، چرخه‌ی (بیماری‌زا) کاتپسین-التهاب در بافت چربی چاق‌ها شکل می‌گیرد که به صورت موضعی باعث مرگ سلول چربی، ظهور نیم‌رخ تاجی شکل و التهاب در بافت چربی و در نهایت موجب بروز مقاومت انسولینی و بروز بیماری‌های مرتبط با چاقی (سندرم متابولیک) می‌شود.^{۴۰}

موضوع جالب توجه این‌که، پژوهش‌گران در سال ۲۰۱۹ و ۲۰۲۰، ارتباط CTSB و اختلال لیپولیز در سطح سلول و بافت چربی را نشان داده‌اند.^{۳۲،۱۵} آن‌ها گزارش کرده‌اند که CTSB افزایش یافته در سلول‌های چربی موجب تجزیه پری لیپین یک^۱ (پروتئین مسئول پوشش قطره لیپیدی در سلول‌های چربی) می‌شود که نتیجه آن افزایش لیپولیز پایه و نشت اسید چرب آزاد از بافت چربی به گردش خون است.^{۱۳،۱۵} اسید چرب افزایش یافته در گردش خون به نوبه خود از طریق سازوکارهای مختلف (همچون رسوب در کبد) موجب تشدید مقاومت انسولینی و بروز عوارض مرتبط با چاقی می‌شود.^{۴۱}

بر اساس مطالب فوق، می‌توان بیان داشت که؛ افزایش بیان CTSB ناشی از تغذیه پرچرب و چاقی، عامل بیماری‌زا در القاء التهاب و مقاومت انسولینی محسوب می‌شود. از این رو، جلوگیری از افزایش بیان و فعالیت این آنزیم (CTSB) در شرایط چاقی را می‌توان به عنوان رویکرد پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با چاقی در نظر گرفت.

یافته‌ی اصلی این مطالعه این بود که میزان بیان ژن CTSB در بافت چربی موش‌هایی که علاوه بر تغذیه پرچرب،

تمرین استقامتی داشتند، در قیاس با گروه غذای پرچرب، کمتر بود. این یافته، بیان‌گر نقش بازدارندگی تمرین استقامتی در افزایش بیان CTSB ناشی از غذای پرچرب است.

تصور می‌شود، تمرین استقامتی از طریق سازوکارهای مرتبط با کاهش وزن و کاهش التهاب، موجب مهار بیان CTSB شده است. یافته قبلی این پژوهش نشان داد که تمرین استقامتی تا حد زیادی از افزایش وزن (و چاقی) ناشی از غذای پرچرب جلوگیری کرد. از سوی دیگر گزارش شده است که تمرینات استقامتی اثر مهاری در برابر افزایش عوامل پیش التهابی در بافت چربی دارد.^{۴۲،۴۳} بنابراین، می‌توان پیشنهاد داد که تمرین استقامتی احتمالاً از طریق جلوگیری از افزایش وزن و عوامل التهابی موجب مهار افزایش بیان CTSB در بافت چربی موش‌های دارای تغذیه پرچرب شده است. هم‌چنین می‌توان استدلال کرد که یکی از سازوکارهایی که تمرین استقامتی باعث پیشگیری از مقاومت انسولینی و عوارض مرتبط با چاقی می‌شود، احتمالاً مربوط به مهار بیان CTSB در سطح بافت چربی احشائی است.

در پژوهش حاضر، غذای پرچرب و تمرین استقامتی، تغییر معنی‌داری در در سطح نسخه‌برداری ژن CTSB در بافت چربی احشائی ایجاد نکرد. با این حال، مطالعات گذشته نشان داده‌اند، بر اثر چاقی ناشی از غذای پرچرب، بیان ژن CTSB در سطح mRNA^{۱۴} و پروتئین^{۱۲} افزایش می‌یابد. این اختلاف احتمالاً مربوط به تفاوت در نحوه ارزیابی بیان ژن باشد. در این پژوهش کارائی PCR در محاسبه بیان ژن لحاظ شد. این احتساب موجب کاهش اندازه (و افزایش دقت) میزان بیان ژن می‌شود.^{۴۴} هم‌چنین، کیت‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری بیان ژن در این پژوهش و مطالعات گذشته از شرکت‌های متفاوت تهیه شده است. در مجموع تصور می‌شود، متغیرهای غیر قابل کنترل، احتمالاً موجب تداخل در نتایج و موجب بروز اختلاف در یافته‌های پژوهش حاضر و مطالعات گذشته شده است. بنابراین، نتیجه‌گیری دقیق در مورد تغییر بیان ژن CTSB بر اثر تمرین استقامتی و تغذیه پرچرب نیاز به مطالعات بیشتری در آینده دارد.

در مدل‌های موشی، تمرین استقامتی-هوازی اغلب به دو شیوه تجویز می‌شود: (۱) دویدن بر روی تردمیل و (۲) دویدن روی چرخ گردان^{۱۱}. در شیوه‌ی اول که در این پژوهش استفاده شد، موش‌ها طبق برنامه‌ای که از قبل توسط

هم‌چنین به دلیل نبود پیشینه تحقیق در زمینه اثر تمرین استقامتی بر بیان این کاتپسین‌ها، نتیجه‌گیری‌های قاطعی در مورد یافته‌های مشاهده شده، صورت نگرفت.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که رژیم غذایی پرچرب تجویز شده، دارای اثر چاق‌کننده بود و در مقابل تمرین استقامتی تجویز شده از بروز چاقی ناشی از غذای پرچرب جلوگیری کرد. بیان ژن CTSB بر اثر مصرف غذای پرچرب و تمرین ورزشی استقامتی دچار تغییر نشد. با این حال، بیان ژن CTSB در بافت چربی موش‌هایی که بر اثر مصرف غذای پرچرب چاق شده بودند، افزایش بارزی یافت. مهم‌تر این‌که، تمرین استقامتی تجویز شده توانست تا حدی از افزایش بیان ناشی از غذای پرچرب در مورد ژن CTSB پیشگیری کند.

از آنجا که مطالعات گذشته نقش بیماری‌زا CTSB در القاء التهاب و مقاومت انسولینی را اثبات کرده‌اند، می‌توان استدلال کرد که یکی از مکانیسم‌هایی که تمرین استقامتی از طریق آن عوارض و بیماری‌های مرتبط با تغذیه پرچرب چاق‌کننده را پیشگیری می‌کند، احتمالاً مربوط به مهار بیان ژن CTSB در سطح بافت چربی احشائی است.

سپاسگزاری: این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی مصوب در دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی می‌باشد (کد سمات: ۱۵۶۶-۱۳۸۲۶). از جناب آقای یزدان فروتن به سبب همراهی در انجام پروتکل‌های مربوط به تداخل‌های پژوهش تشکر می‌شود. از جناب دکتر مهدی بهمنی به سبب ارائه مشاوره‌های سازنده در اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض در منافع در این پژوهش وجود ندارد.

پژوهش‌گر تعیین می‌شود، تمرین می‌کنند، در حالی‌که در شیوه‌ی دوم، موش‌ها آزادانه و با کمترین دخالت پژوهش‌گر تمرین می‌کنند.^{۴۵} تحقیقات نشان داده‌اند که در مدل چرخ گردان در قیاس با مدل تردمیل، موش‌ها به مدت زیاد (مسافت بیشتر) و با سرعت کمتر تمرین می‌کنند؛ که دلالت بر انجام تمرین با حجم بیشتر و شدت کمتر دارد. با این حال، نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که اثرات متابولیکی ناشی از این دو مدل تمرین، به‌ویژه در مورد کاهش وزن و کاهش چربی مشابه است.^{۴۶} در این پژوهش به منظور مدیریت بهتر شدت و حجم تمرین از شیوه تردمیل استفاده شد.

هم‌چنین، در دهه‌ی اخیر، نقش تمرین‌های تناوبی با شدت زیاد در کاهش وزن و بیماری‌های متابولیکی مرتبط با چاقی، به دلیل صرفه جویی در زمان مورد توجه قرار گرفته است.^{۴۷} برخی مطالعات، نتایج مشابه‌ای در مورد اثر مفید این دو مدل تمرین ورزشی (یعنی تداومی و تناوبی) بر مشخصه‌های چاقی و بیماری‌های مرتبط با چاقی نشان داده‌اند.^{۴۷} با وجود این، مطالعات در زمینه سازگاری‌های متابولیکی ناشی از تمرینات تناوبی شدید در سطح بافت چربی محدود است و از این رو، نیاز به مطالعات بیشتر است.

در این مطالعه، اثر بازدارنده (یا پیشگیری‌کننده) تمرین استقامتی از بیان کاتپسین‌ها در موش‌هایی که از طریق غذای پرچرب به سمت چاقی گرویده شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. به عبارت بهتر، اثر تمرین استقامتی حین چاق شدن آزمودنی‌ها بررسی شد و ونه پس از ابتلا به چاقی. بنابراین، اثر کاهنده (یا درمانی) تمرین استقامتی در بیان این کاتپسین‌ها نامشخص ماند. هم‌چنین در این مطالعه امکان اندازه‌گیری میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی کاتپسین‌ها، میسر نشد که به عنوان محدودیت پژوهش پذیرفته می‌شود.

References

- Ginsberg HN, MacCallum PR. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr* 2009; 4: 113-9.
- Frühbeck G, Yumuk V. Obesity: a gateway disease with a rising prevalence. *Obesity Facts* 2014; 7: 33-6.
- Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; 117: 241-50.
- Zhang Y, Sowers JR, Ren J. Targeting autophagy in obesity: from pathophysiology to management. *Nature Reviews Endocrinology* 2018; 14: 356-76.
- Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20: 2358.
- Mizunoe Y, Sudo Y, Okita N, Hiraoka H, Mikami K, Narahara T, et al. Involvement of lysosomal dysfunction in autophagosome accumulation and early pathologies in adipose tissue of obese mice. *Autophagy* 2017; 13: 642-53.
- Gornicka A, Fettig J, Eguchi A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, et al. Adipocyte hypertrophy is associated with lysosomal permeability both in vivo and in vitro: role in adipose tissue inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303: E597-E606.
- Reiser J, Adair B, and Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* 2010; 120: 3421-31.

9. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim et Biophys Acta* 2012; 1824: 68-88.
10. Kaminsky V and Zhivotovsky B. Proteases in autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824: 44-50.
11. Mizunoe Y, Kobayashi M, Tagawa R, Nakagawa Y, Shimano H, Higami Y. Association between Lysosomal Dysfunction and Obesity-Related Pathology: A Key Knowledge to Prevent Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3688.
12. Hannaford J, Guo H, Chen X. Involvement of cathepsins B and L in inflammation and cholesterol trafficking protein NPC2 secretion in macrophages. *Obesity* 2013; 21: 1586-95.
13. Ju L, Han J, Zhang X, Deng Y, Yan H, Wang C, et al. Obesity-associated inflammation triggers an autophagy-lysosomal response in adipocytes and causes degradation of perilipin 1. *Cell Death Dis* 2019; 10: 1-16.
14. Naour N, Rouault C, Fellahi S, Lavoie M-E, Poitou C, Keophipath M, et al. Cathepsins in human obesity: changes in energy balance predominantly affect cathepsins in adipose tissue and in circulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1861-8.
15. Mizunoe Y, Kobayashi M, Hoshino S, Tagawa R, Itagawa R, Hoshino A, et al. Cathepsin B overexpression induces degradation of perilipin 1 to cause lipid metabolism dysfunction in adipocytes. *Sci Rep* 2020; 10: 1-12.
16. Yang M, Zhang Y, Pan J, Sun J, Liu J, Libby P, et al. Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 970-7.
17. Poirier P, Després J-P. Exercise in weight management of obesity. *Cardiol Clin* 2001; 19: 459-70.
18. O'Gorman DJ, Krook A. Exercise and the treatment of diabetes and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; 37: 887-903.
19. Zouhal H, Ben Abderrahman A, Khodamoradi A, Saeidi A, Jayavel A, Hackney AC, et al. Effects of physical training on anthropometrics, physical and physiological capacities in individuals with obesity: A systematic review. *Obes Rev* 2020; 21: e13039.
20. Wilcox A. Endurance Exercise and Adipose Tissue. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2002; 34: 1399.
21. Tsiloulis T, Watt MJ. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 135: 175-201.
22. Thompson D, Karpe F, Lafontan M, and Frayn K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol Rev* 2012; 92: 157-91.
23. Collins S, Martin TL, Surwit RS, and Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81: 243-8.
24. Ahmadi-Noorbakhsh S. Sample size calculation for animal studies-with emphasis on the ethical principles of reduction of animal use. *Research in Medicine* 2018; 42: 144-53. [Farsi] Available from: URL: <http://pejouhesh.sbm.ac.ir/article-1-1886-en.html>
25. Kregel KC, Allen DL, Booth FW, Fleshner MR, Henriksen EJ, Musch T, et al. Resource book for the design of animal exercise protocols. Washington, D.C.: American Physiological Society 2006; 152. Available from: URL: <https://olaw.nih.gov/resources/publications/animal-exercise-protocols-2006.htm>
26. 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 Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14: 753-60.
27. Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO(2 max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1301-10.
28. Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR-alpha activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat and high-fructose-fed mice. *Nutrition* 2020; 110791.
29. Moon HY, Becke A, Berron D, Becker B, Sah N, Benoni G, et al. Running-induced systemic cathepsin B secretion is associated with memory function. *Cell Metab* 2016; 24: 332-40.
30. Yamada A, Ishimaru N, Arakaki R, Katunuma N, and Hayashi Y. Cathepsin L Inhibition Prevents Murine Autoimmune Diabetes via Suppression of CD8+ T Cell Activity. *PLOS One* 2010; 5: e12894.
31. Liu L, Tao Z, Zheng LD, Brooke JP, Smith CM, Liu D, et al. FoxO1 interacts with transcription factor EB and differentially regulates mitochondrial uncoupling proteins via autophagy in adipocytes. *Cell Death Discov* 2016; 2: 1-8.
32. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.
33. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010; 23: 270-99.
34. Lee MO. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1929; 89: 24-33.
35. Lang P, Hasselwander S, Li H, Xia N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Sci Rep* 2019; 9: 1-14.
36. Cummins TD, Holden CR, Sansbury BE, Gibb AA, Shah J, Zafar N, et al. Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 307: E262-E277.
37. Yang Y, Smith Jr DL, Keating KD, Allison DB, Nagy TR. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity* 2014; 22: 2147-55.
38. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, et al. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000; 106: 1127-37.
39. Wang L, Chen Y, Li X, Zhang Y, Gulbins E, Zhang Y. Enhancement of endothelial permeability by free fatty acid through lysosomal cathepsin B-mediated Nlrp3 inflammasome activation. *Oncotarget* 2016; 7: 73229-241.
40. Van Greevenbroek M, Schalkwijk C, and Stehouwer C. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med* 2013; 71: 174-87.
41. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 142-8.
42. Sakurai T, Ogasawara J, Shirato K, Izawa T, Oh-Ishi S, Ishibashi Y, et al. Exercise training attenuates the dysregulated expression of adipokines and oxidative stress in

- white adipose tissue. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 9410954.
43. Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Ishibashi Y, Takahashi M, et al. The Effects of Exercise Training on Obesity-Induced Dysregulated Expression of Adipokines in White Adipose Tissue. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 801743.
44. Khodadadi A, Hamidi NM, Ghaforian M, Mohammadi AJ. Evaluation of real-time PCR efficiency by the use of two strategies: standard curve and linear regression. *Jundishapur Scientific Medical Journal* 2012; 76: 85-95. [Farsi]
45. Thu VT, Kim HK, Han J. Acute and chronic exercise in animal models, in *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment*. Germany: Springer Nature 2017; P 55-71.
46. Kim YJ, Kim HJ, Lee WJ, and Seong JK. A comparison of the metabolic effects of treadmill and wheel running exercise in mouse model. *Lab Anim Res* 2020; 36: 3.
47. Andreato L, Esteves J, Coimbra D, Moraes A, and de Carvalho T. The influence of high-intensity interval training on anthropometric variables of adults with overweight or obesity: a systematic review and network meta-analysis. *Obes Rev* 2019; 20: 142-55.

Original Article

Effects of Endurance Training on the Expression of Cathepsin B (CTSB) and Cathepsin L (CTSL) genes in the Adipose Tissue of Mice with a High-Fat Diet

Daneshyar S¹, Shokati Basir S², Jalali Moghim F³

¹Department of Physical Education, Faculty of Humanities, University of Ayatollah Arozma Boroujerdi, Lorestan, Iran, ²Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, University of Guilan, Guilan, Iran,

³Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. Iran

e-mail: f.jalali@yahoo.com

Received: 22/06/2020 Accepted: 09/01/2021

Abstract

Introduction: In high-fat diet-induced obesity, the levels of cathepsin L (CTSL) and cathepsin B (CTSB) increase in adipocytes, resulting in insulin resistance in the adipose tissue. In this study, the preventive effect of endurance training on the gene expression of CTSL and CTSB was investigated in the adipose tissue of mice with a high-fat diet. **Materials and Methods:** Twenty-one male mice (age: four weeks, weight: 12 g) were assigned to three groups, including control (n=7), high-fat diet (HFD) (n=7), and endurance training/high-fat diet (ET-HFD) (n=7). The mice of the HFD group were fed HFD (42% fat) for 12 weeks. The mice in the ET-HFD group, along with HFD feeding, were submitted to continuous endurance training on a treadmill for six weeks (five sessions per week), with a progressive increase in intensity and volume. The real-time polymerase chain reaction (PCR) assay was used to assess the gene expression of CTSL and CTSB. **Results:** The HFD was fattening (P=0.001). The gene expression of CTSL did not significantly change in the groups (P=0.118). However, the gene expression of CTSB increased fivefold in the HFD group as compared to the control group (P=0.001). The increase in the level of CTSB was 50% lower in the ET-HFD group compared to the HFD group (P=0.013). **Conclusion:** Endurance training could partially prevent the upregulation of CTSB induced by a high-fat diet. It seems that the preventive effect of endurance training against obesity-related complications is partly due to the inhibition of CTSB expression in the adipose tissue.

Keywords: Obesity, Lysosome, Autophagy, Insulin Resistance