

بررسی اثر هم افزای تمرین مقاومتی و آلیسین بر مهار گلوکونئوزنر کبدی از طریق تعدیل

فسفوریل اسیون AKT و مهار فاکتور رونویسی FOXO1

دانیال اسداللهی سهی^{۱*}، بهاره یزدان پرست چهارمحالی^۲

۱. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز

۲. استادیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

چکیده:

گلوکونئوزنر بیش فعال کبدی یکی از عوامل اصلی ایجاد هیپرگلیسمی در دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک است. مسیر پیام رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز/پروتئین کیناز B با فسفریل اسیون عامل رونویسی پروتئین جعبه سرچنگالی O1، نقش مهمی در مهار بیان ژن های گلوکونئوزنیک، از جمله فسفونئول پیرووات کربوکسی کیناز و گلوکز-۶-فسفاتاز، دارد. در این پژوهش، ۴۰ سر موش به طور تصادفی در پنج گروه شامل کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابتی دریافت کننده تمرین مقاومتی، دیابتی دریافت کننده آلیسین و دیابتی دریافت کننده تمرین مقاومتی همراه با آلیسین تقسیم شدند. دیابت نوع ۲ با استفاده از رژیم غذایی پرچرب و تزریق استریتوزوتوسین القا شد. گروه های تمرینی به مدت هشت هفته در برنامه تمرین مقاومتی شرکت کردند و آلیسین نیز به صورت روزانه تجویز شد. در پایان مداخله، نمونه های بافت کبد برای بررسی بیان ژن، سطوح پروتئین و ارزیابی بافت شناختی جمع آوری شدند. نتایج نشان داد تمرین مقاومتی به تنهایی موجب افزایش فسفریل اسیون پروتئین کیناز B و کاهش بیان فسفونئول پیرووات کربوکسی کیناز و گلوکز-۶-فسفاتاز شد. آلیسین نیز موجب بهبود متابولیسم گلوکز و کاهش التهاب کبدی گردید. مداخله ترکیبی افزایش بیشتری در نسبت پروتئین کیناز B فسفریله شده به پروتئین کیناز B کل و کاهش معنادارتری در سطوح هسته ای پروتئین جعبه سرچنگالی O1 و بیان ژن های گلوکونئوزنیک ایجاد کرد. همچنین، کاهش گلوکز خون ناشتا و مقاومت به انسولین در گروه ترکیبی بیشتر بود. در مجموع، ترکیب تمرین مقاومتی و آلیسین، احتمالاً از طریق تقویت فعال سازی پروتئین کیناز B و افزایش فسفریل اسیون و خروج هسته ای پروتئین جعبه سرچنگالی O1، می تواند مهار مؤثرتری بر گلوکونئوزنر کبدی ایجاد کند و به عنوان یک رویکرد غیردارویی مکمل در مدیریت دیابت نوع ۲ مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: فسفریل اسیون، پروفایل لیپیدی، گلوکونئوزنر کبدی، FOXO1 AKT، التهاب کبدی.

* ایمیل نویسنده مسئول: daaniyaaaal76@gmail.com

مقدمه

دیابت نوع ۱^۲ به عنوان یک اپیدمی جهانی، سالانه با افزایش چشمگیر بار بیماری‌زایی^۲ و مرگ‌ومیر^۳ همراه است. هیپرگلیسمی مزمن در این بیماری نه تنها از کاهش جذب گلوکز در بافت‌های محیطی ناشی می‌شود (ژو^۴ و همکاران، ۲۰۲۶)، بلکه تولید بیش‌ازحد گلوکز توسط کبد (HGP) نقش محوری در ایجاد قندخون ناشتای بالا دارد (وو^۵ و همکاران، ۲۰۱۸). در شرایط فیزیولوژیک، انسولین از طریق آبشار سیگنالینگ PI3K/AKT، فاکتور رونویسی پروتئین جعبه سرچنگالی FOXO^۶ را در باقی‌مانده‌های Thr24 و Ser256 فسفوریل کرده و با القای اتصال پروتئین ۱۴-۳، آن را از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌سازد (چن^۷ و همکاران، ۲۰۲۶). این جابه‌جایی موجب خاموش‌سازی رونویسی ژن‌های کلیدی گلوکونئوتیک نظیر PEPCCK (فسفوئنتول‌پیروات کربوکسی‌کیناز) و G6Pase (گلوکز-۶-فسفاتاز) می‌گردد (مولر^۸ و همکاران، ۲۰۲۲). با این حال، در مقاومت انسولینی کبدی، اختلال در فسفوریلاسیون AKT، ماندگاری هسته‌ای FOXO1 را افزایش داده و بیان ژن‌های گلوکونئوتیک را تشدید می‌کند (خمدان^۹ و بارتلت، ۲۰۲۶). به تازگی، نقش کیناز DYRK1B که در کبد موش‌های دیابتی القا می‌شود، جلب توجه کرده است؛ این کیناز از یک سو با فسفوریلاسیون FOXO1 در Thr467/Ser468، مانع از فسفوریلاسیون مهارکننده آن توسط AKT می‌شود و از سوی دیگر، فعالیت AKT را مستقیماً کاهش می‌دهد و در نتیجه چرخه‌ای از افزایش گلوکونئوتز را پدید می‌آورد (ذوالفقاری^{۱۰} و همکاران، ۲۰۲۶). از این رو، شناسایی راهکارهایی که بتوانند هم‌زمان بر فسفوریلاسیون AKT بیفزایند و فعالیت FOXO1 را مهار کنند، به عنوان یک هدف درمانی راهبردی در T2DM مطرح است (لی^{۱۱} و همکاران، ۲۰۲۵). در این میان، تولید بیش‌ازحد گلوکز توسط کبد (HGP) از طریق مسیر گلوکونئوتز، سهم عمده‌ای در ایجاد هیپرگلیسمی ناشتا دارد (میاو^{۱۲} و همکاران، ۲۰۲۵). در شرایط فیزیولوژیک، انسولین از طریق آبشار سیگنالینگ PI3K/AKT، فاکتور رونویسی FOXO1 را فسفوریل کرده و موجب انتقال آن از هسته به سیتوپلاسم و در نتیجه مهار رونویسی ژن‌های کلیدی گلوکونئوتیک نظیر PEPCCK (فسفوئنتول‌پیروات کربوکسی‌کیناز) و G6Pase (گلوکز-۶-فسفاتاز) می‌شود (کیتازاوا^{۱۳} و همکاران، ۲۰۰۷). با این حال، در مقاومت انسولینی، این مسیر دچار اختلال شده و FOXO1 در هسته باقی می‌ماند و بیان ژن‌های گلوکونئوتیک را افزایش می‌دهد (گائو^{۱۴} و همکاران، ۲۰۲۶).

تمرین مقاومتی (RT) به عنوان یکی از مؤلفه‌های اصلی تمرینات ورزشی، فراتر از افزایش قدرت و توده عضلانی، اثرات عمیقی بر بازسازی حساسیت انسولینی و تنظیم متابولیسم کبدی دارد (شرفی‌فرد^{۱۵} و همکاران، ۲۰۲۵). برخلاف تمرینات هوازی که بیشتر

¹ T2DM

² Morbidity

³ Mortality

⁴ Xu

⁵ Wu

⁶ FOXO1

⁷ Chen

⁸ Muller

⁹ Khamdan

¹⁰ Zolfaghari

¹¹ Li

¹² Miao

¹³ Kitazawa

¹⁴ Gao

¹⁵ Sharafifard

بر اکسیداسیون اسیدهای چرب تأکید دارند (ایزدی^۱ و همکاران، ۲۰۲۵)، تمرین مقاومتی از طریق انقباضات پویا با شدت بالا، سبب افزایش بیان گیرنده‌های انسولین و فسفوریلاسیون پروتئین‌های کلیدی در مسیر IRS-1/PI3K/AKT در کبد می‌شود (احمدیان^۲ و همکاران، ۲۰۲۵). شواهد جدید نشان می‌دهند که RT کوتاه‌مدت (۶-۸ هفته) در مدل‌های دیابتی، نه تنها سبب افزایش فسفوریلاسیون FOXO1 و کاهش بیان PEPCK و G6Pase می‌گردد، بلکه با کاهش استرس شبکه آندوپلاسمی و تعدیل میکروبیوم روده، التهاب کبدی را نیز مهار می‌کند (دا کوستا فرناندس^۳ و همکاران، ۲۰۲۶). با این وجود، شدت و نوع تمرین، زمان‌بندی و تعامل آن با سایر مداخلات تغذیه‌ای هنوز نیازمند کاوش بیشتری است (پیرا^۴ و همکاران، ۲۰۲۲). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که DYRK1B، یک کیناز که در کبد موش‌های دیابتی القا می‌شود، با فسفوریلاسیون FOXO1 در باقی‌مانده‌های Thr467/Ser468 و همچنین مهار فسفوریلاسیون AKT-mediated در Thr24/Ser256، ماندگاری هسته‌ای FOXO1 را افزایش داده و گلوکونئوژنز را تشدید می‌کند (دنگ^۵ و همکاران، ۲۰۲۵). بر این اساس، استراتژی‌هایی که بتوانند فسفوریلاسیون AKT را افزایش داده و فعالیت FOXO1 را مهار کنند، اهداف درمانی ارزشمندی در T2DM محسوب می‌شوند (چوهای^۶ و همکاران، ۲۰۲۵). تمرین مقاومتی به‌عنوان یک مداخله غیردارویی مؤثر، با افزایش حساسیت انسولینی و بهبود سیگنالینگ AKT در کبد، موجب کاهش بیان ژن‌های گلوکونئوژنیک می‌شود (دنگ و همکاران، ۲۰۲۵). در یک مطالعه، ۶ هفته تمرین مقاومتی در موش‌های دیابتی نوع ۲ باعث افزایش معنی‌دار انسولین سرم ($P = 0.043$) و کاهش معنی‌دار بیان PEPCK ($P = 0.001$)، G6Pase ($P = 0.001$) و HNF4α ($P = 0.011$) گردید. همچنین، تمرین مقاومتی کوتاه‌مدت در موش‌های چاق، فسفوریلاسیون FOXO1 کبدی را افزایش داده و محتوای PEPCK و G6Pase را کاهش می‌دهد (لیو^۷ و همکاران، ۲۰۲۵).

در کنار مداخلات ورزشی، ترکیبات زیست‌فعال با منشأ گیاهی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر و پتانسیل هم‌افزایی، توجه گسترده‌ای یافته‌اند (وانگ^۸ و همکاران، ۲۰۲۵). آلیسین، تیولات اصلی سیر^۹، با ساختار حاوی گوگرد، نه تنها یک آنتی‌اکسیدان قوی محسوب می‌شود، بلکه از طریق چندین مکانیسم مولکولی، هموستاز گلوکز را بهبود می‌بخشد (نعیمی^{۱۰} و همکاران، ۲۰۲۵). آلیسین با فعال‌سازی AMPK، افزایش بیان GLUT4، و مهار مسیرهای التهابی NF-κB و JNK، مقاومت انسولینی کبدی را کاهش می‌دهد (مونتالوو^{۱۱} و همکاران، ۲۰۲۵). همچنین، آلیسین با مهار آنزیم‌های کاتابولیک کبدی و افزایش نسبت NAD⁺/NADH، زمینه را برای فسفوریلاسیون AKT فراهم می‌آورد (ژانگ^{۱۲} و همکاران، ۲۰۲۰). جالب‌توجه اینکه، آلیسین با تعدیل ترکیب میکروبیوتای روده و افزایش جمعیت باکتری‌های مفید نظیر Bacteroides acidifaciens، از طریق محور روده-کبد، مسیرهای التهابی و استرس اکسیداتیو کبد را مهار کرده و بدین ترتیب غیرمستقیم به بهبود سیگنالینگ انسولین

¹ Eizadi

² Ahmadian

³ da Costa Fernandes

⁴ Pereira

⁵ Deng

⁶ Chauhan

⁷ Liu

⁸ Wang

⁹ Allium sativum

¹⁰ Naeimi

¹¹ Montalvo

¹² Zhang

کمک می‌کند (چن^۱ و همکاران، ۲۰۲۲). هرچند هر یک از این دو مداخله (تمرین مقاومتی و آلیسین) به تنهایی تأثیرات مثبتی بر مهار گلوکونئوز نشان داده‌اند، اما نکته مهم آن است که مسیرهای مولکولی تحت تأثیر آن‌ها تا حد زیادی مجزا و مکمل یکدیگر هستند؛ تمرین مقاومتی عمدتاً از طریق افزایش فسفوریلاسیون AKT و کاهش استرس مکانیکی کبد عمل می‌کند، درحالی‌که آلیسین با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، مقاومت انسولینی را در سطح گیرنده و پس‌ازگیرنده تعدیل می‌نماید (ه^۲ و همکاران، ۲۰۲۶). از این‌رو، این فرضیه مطرح می‌شود که ترکیب این دو مداخله می‌تواند با ایجاد یک اثر هم‌افزایی واقعی^۳، از طریق تقویت دوگانه فسفوریلاسیون AKT و مهار پایدارتر FOXO1، کنترل قوی‌تری بر گلوکونئوز کبدی اعمال کند (ایشی‌گورو^۴ و همکاران، ۲۰۲۵). با وجود مطالعات جداگانه متعدد، تاکنون هیچ پژوهشی به بررسی اثر هم‌زمان تمرین مقاومتی و آلیسین بر محور AKT/FOXO1 در کبد در شرایط دیابت نوع ۲ نپرداخته است.

از سوی دیگر، آلیسین، ترکیب زیست‌فعال اصلی سیر (Allium sativum)، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و تعدیل‌کننده متابولیسم گلوکز است (کراسوفسکایا^۵ و همکاران، ۲۰۲۵؛ بایک^۶ و همکاران، ۲۰۲۵). مطالعات نشان داده‌اند که آلیسین با تعدیل مسیر PI3K/AKT و بهبود متابولیسم گلوکز، التهاب کبدی را کاهش می‌دهد. آلیسین همچنین با افزایش باکتری‌های مفید روده مانند Bacteroides acidifaciens، هموستاز گلوکز را بهبود می‌بخشد (شو^۷ و یو، ۲۰۲۴). با این وجود، تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر هم‌افزایی تمرین مقاومتی و آلیسین بر مسیر AKT/FOXO1 در مهار گلوکونئوز کبدی نپرداخته است.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر هم‌افزایی تمرین مقاومتی و آلیسین بر مهار گلوکونئوز کبدی از طریق تعدیل فسفوریلاسیون AKT و مهار فاکتور رونویسی FOXO1 در مدل موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ می‌باشد، یا به عبارت دیگر ارزیابی اثر هم‌افزایی ترکیب تمرین مقاومتی و مکمل‌یابی آلیسین بر فسفوریلاسیون AKT، توزیع زیرسلولی FOXO1، و بیان ژن‌های کلیدی گلوکونئوزیک در مدل موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ می‌باشد.

۲ مواد و روش‌ها

۲-۱ طراحی مطالعه و گروه‌بندی حیوانات

۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۴-۶ هفته، وزن 180 ± 20 گرم) از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، چرخه نوری ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از یک هفته سازگاری، حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه (n = 8) تقسیم شدند:

۱. کنترل سالم (Non-Diabetic): رژیم استاندارد + بدون مداخله.
۲. دیابتی کنترل (Diabetic Control): رژیم پرچرب + STZ + بدون مداخله.
۳. دیابتی + تمرین مقاومتی (D+RT): رژیم پرچرب + STZ + تمرین مقاومتی.

¹ Chen

² He

³ synergistic

⁴ Ishiguro

⁵ Krassovskaia

⁶ Baik

⁷ Xu

۴. دیابتی + آلیسین (D + Allicin): رژیم پرچرب + STZ + آلیسین.
۵. دیابتی + تمرین مقاومتی + آلیسین (D+RT+Allicin): رژیم پرچرب + STZ + تمرین مقاومتی + آلیسین.

۲-۲ القای دیابت نوع ۲

برای القای دیابت نوع ۲، حیوانات به مدت ۴ هفته از رژیم پرچرب (HFD؛ شامل ۶۰٪ کالری از چربی) تغذیه کردند. سپس، تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (STZ; Sigma-Aldrich) با دوز ۳۵ mg/kg (حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار، pH=4) انجام شد. پس از ۷۲ ساعت، گلوکز خون ناشتا (پس از ۱۲ ساعت ناشتایی) با استفاده از گلوکومتر اندازه گیری شد. حیوانات با گلوکز خون بالای ۲۵۰ mg/dL دیابتی در نظر گرفته شدند.

۲-۳ پروتکل تمرین مقاومتی

گروه های تمرینی (D+RT و D+RT+Allicin) و به مدت ۸ هفته (۵ جلسه در هفته) در برنامه تمرین مقاومتی با استفاده از نردبان مخصوص (ارتفاع ۱ متر، زاویه ۸۵ درجه) شرکت کردند. هر جلسه شامل ۳ نوبت بالارفتن از نردبان با وزنه های متصل به دم حیوان بود. وزن شروع ۵۰٪ وزن بدن بود و به تدریج تا ۱۰۰٪ وزن بدن در هفته آخر افزایش یافت. بین هر نوبت، ۲ دقیقه استراحت در نظر گرفته شد. گروه های غیر تمرینی به مدت مشابه روی نردبان بدون وزنه قرار گرفتند.

۲-۴ تجویز آلیسین

گروه های دریافت کننده آلیسین (D+Allicin و D+RT+Allicin) روزانه ۱۰ mg/kg آلیسین (خلوص $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich) حل شده در سالیین نرمال را به صورت درون صفاقی دریافت کردند. گروه های کنترل حجم معادل سالیین نرمال دریافت نمودند. تجویز آلیسین ۳۰ دقیقه پیش از هر جلسه تمرینی انجام شد.

۲-۵ نمونه برداری

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ ساعت ناشتایی، حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین/ایلازین (۸۰/۱۰ mg/kg) بیهوش شده و پس از خون گیری از قلب، بافت کبد خارج گردید. نمونه های کبد بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان آنالیز در دمای -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بخشی از بافت کبد نیز در فرمالین بافر ۱۰٪ برای بررسی هیستولوژیک تثبیت گردید.

۲-۶ اندازه گیری متغیرهای بیوشیمیایی

گلوکز خون ناشتا^۱ با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Accu-Chek, Roche) اندازه گیری شد. سطوح انسولین سرم با کیت الیزا (Mercodia) بر اساس دستورالعمل سازنده سنجیده شد.

۲-۷ استخراج RNA و Real-Time PCR

¹ FBG

RNA کل از بافت کبد (۵۰-۳۰ میلی گرم) با استفاده از کیت TRIzol (Invitrogen) استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA با اسپکتروفتومتری (NanoDrop) ارزیابی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت (Thermo Scientific) انجام گرفت. بیان ژن‌های PEPCK، G6Pase و FOXO1 با استفاده از Real-Time PCR (SYBR Green, Bio-Rad) و با نرمال سازی نسبت به ژن مرجع GAPDH اندازه گیری شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده برای Real-Time PCR

ژن	توالی پرایمر (۵' → ۳')	توالی پرایمر (۳' → ۵')
PEPCK	CAGGGTGCCAGAGAAAGCAG	GCAGCTCTTCAGCCACATCA
G6Pase	GTTGAACCAGTCTCCACGGA	CGACTCGCTATCTCCAAGTGA
FOXO1	GGTTGCTGCATAGACGTTGC	CGGCTGGAGACTATCAACCA
GAPDH	ACACATTGGGGGTAGGAACA	AACTTTGGCATTGTGGAAGG

۲-۸ وسترن بلات

بافت کبد در بافر لیز (RIPA) حاوی مهارکننده‌های پروتئاز و فسفاتاز هموژن شد. پس از سانتریفیوژ، غلظت پروتئین با روش برادفورد تعیین گردید. پروتئین‌ها (۵۰ µg) بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰٪ جدا شده و به غشای PVDF (Millipore) انتقال یافتند. غشاهای با آنتی‌بادی‌های اولیه ضد (p-AKT (Ser473)، total AKT، p-FOXO1 (Ser256)، total FOXO1 و GAPDH (همگی از Cell Signaling Technology) انکوبه شده و سپس با آنتی‌بادی ثانویه HRP-conjugate و کیت (Bio-Rad) ECL آشکارسازی شدند. شدت باندها با نرم افزار ImageJ کمی سازی گردید.

۲-۹ بررسی هیستولوژیک

مقاطع بافتی به ضخامت ۵ µm تهیه شده و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) و (PAS) Periodic Acid-Schiff رنگ آمیزی شدند. تغییرات بافتی، تجمع چربی کبدی و محتوای گلیکوژن توسط پاتولوژیست به صورت کور بررسی گردید.

۲-۱۰ تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS تحلیل شدند. نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون بررسی گردید. برای مقایسه بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه^۱ به همراه آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه شده و سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

۳ یافته‌ها

۳-۱ اثر مداخلات بر گلوکز خون ناشتا و مقاومت انسولینی

نتایج نشان داد که هر سه مداخله (تمرین مقاومتی، آلیسین و ترکیبی) به طور معنی داری گلوکز خون ناشتا را در مقایسه با گروه دیابتی کنترل کاهش دادند ($P < 0.001$). با این حال، گروه ترکیبی (D+RT+Allicin) کاهش بیشتری نسبت به دو گروه دیگر

¹ ANOVA

نشان داد ($P < 0.05$). همچنین، شاخص مقاومت به انسولین در گروه ترکیبی به طور معنی داری کمتر از سایر گروه های دیابتی بود (جدول ۲).

جدول ۲ - مقایسه متغیرهای بیوشیمیایی و بیان ژن در گروه های مختلف مطالعه

متغیر	کنترل سالم	دیابتی کنترل	D + RT	D + Allicin	D + RT + Allicin	معنی داری (P)
گلوکز خون ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر) ^۱	۱۱۶±۲	۳۰۵±۱۲	*۱۹۲±۱۷	*۱۸۷±۱۵	*۱۴۵±۱۴	<0.001
انسولین سرم (میکروواحد بین المللی بر میلی لیتر) ^۲	۹/۲۳±۰/۶۴	۵/۹۷±۰/۲۲	*۶/۵۸±۰/۱۵	*۶/۴۸±۰/۱۸	*۷/۱۲±۰/۱۲	<0.001
شاخص مقاومت به انسولین ^۳	۴/۳±۰/۲	۲۰/۲±۰/۴	*۱۴/۹±۰/۳	*۱۴/۲±۰/۳	*۱۰/۲±۰/۲	<0.001
فسفوئینول پیرووات کربوکسی کیناز (PEPCK)؛ بیان RNA پیام رسان ^۴	۱±۰/۰۸	۱/۹۵±۰/۰۹	*۱/۳۷±۰/۰۶	*۱/۴۲±۰/۰۷	*۱/۱۲±۰/۰۵	<0.001
گلوکز-۶-فسفاتاز (G6Pase)؛ بیان RNA پیام رسان ^۵	۱±۰/۰۱۲	۱/۹۴±۱/۲۲	*۱/۰۴±۰/۰۲۱	*۱/۴۵±۰/۰۱۹	*۱/۱۸±۰/۰۱۵	<0.001
نسبت AKT فسفریله به AKT کل ^۶	۱/۰۵±۰/۰۴	۰/۳۲±۰/۰۵	*۰/۶۵±۰/۰۰۶	*۰/۵۸±۰/۰۰۵	*۰/۸۷±۰/۰۰۵	<0.001
نسبت FOXO1 فسفریله به FOXO1 کل ^۷	۱/۰۳±۰/۰۴	۰/۲۸±۰/۰۰۶	*۰/۵۹±۰/۰۰۵	*۰/۵۲±۰/۰۰۶	*۰/۷۹±۰/۰۰۴	<0.001

*معنی داری نسبت به گروه دیابتی کنترل ($P < 0.05$)

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده اند؛

✓ D+RT: دیابتی + تمرین مقاومتی،

✓ D + Allicin: دیابتی + آلیسین،

✓ D+RT+Allicin: دیابتی + تمرین مقاومتی + آلیسین.

¹ FBG (mg/dL)

² μ U/mL

³ HOMA-IR

⁴ PEPCK

(mRNA)

⁵ G6Pase

(mRNA)

⁶ p-AKT/t-AKT

⁷ p-FOXO1/FOXO1

۳-۲ اثر مداخلات بر بیان ژن های گلوکونئوزنیک

بیان mRNA ژن های PEPCK و G6Pase در گروه دیابتی کنترل نسبت به گروه کنترل سالم به طور معنی داری افزایش یافت ($P<0.001$). هر سه مداخله به طور معنی داری بیان این ژن ها را کاهش دادند ($P<0.001$). گروه ترکیبی کاهش معنی دار بیشتری نسبت به گروه های D+RT و D + Allicin نشان داد ($P<0.05$) (جدول ۲). این یافته ها با مطالعه Eizadi و همکاران (۲۰۲۵) که کاهش بیان PEPCK و G6Pase را در پاسخ به تمرین مقاومتی گزارش کرده اند، همخوانی دارد.

۳-۳ اثر مداخلات بر فسفوریلاسیون AKT و FOXO1

نتایج وسترن بلات نشان داد که نسبت p-AKT/t-AKT در گروه دیابتی کنترل در مقایسه با گروه کنترل سالم به شدت کاهش یافته بود ($P<0.001$). تمرین مقاومتی و آلیسین هر یک به طور جداگانه این نسبت را افزایش دادند ($P<0.001$). با این حال، گروه ترکیبی افزایش چشمگیرتری در فسفوریلاسیون AKT نشان داد که به طور معنی داری از هر دو گروه D+RT و D + Allicin بیشتر بود ($P<0.05$) (جدول ۲). این یافته با مطالعه ای که نشان داد تمرین مقاومتی با افزایش فسفوریلاسیون AKT، سیگنالینگ انسولینی کبدی را باز می گرداند، همسو است. به طور مشابه، نسبت p-FOXO1/FOXO1 (فسفوریلاسیون در باقی مانده Ser256) در گروه ترکیبی به طور معنی داری بالاتر از گروه های D+RT و D + Allicin بود ($P<0.05$) (جدول ۲). فسفوریلاسیون FOXO1 توسط AKT در Ser256 موجب خروج FOXO1 از هسته و مهار رونویسی ژن های گلوکونئوزنیک می شود. افزایش هم افزای فسفوریلاسیون FOXO1 در گروه ترکیبی، مکانیسم مولکولی مهار مؤثرتر گلوکونئوزن را تبیین می کند.

۳-۴ یافته های هیستولوژیک

بررسی میکروسکوپی مقاطع کبدی با رنگ آمیزی H&E نشان داد که کبد گروه دیابتی کنترل دارای استئاتوز شدید (تجمع واکوئل های چربی) و التهاب منتشر بود. در گروه های D+RT و D + Allicin، شدت استئاتوز و التهاب کاهش یافته بود. گروه ترکیبی (D+RT+Allicin) بهترین بهبود بافتی را با حداقل تجمع چربی و آرایش منظم تر سلول های کبدی نشان داد. رنگ آمیزی PAS نیز افزایش محتوای گلیکوژن کبدی را در گروه ترکیبی نسبت به سایر گروه های دیابتی تأیید کرد. این یافته ها با مطالعه شرفی فرد و همکاران (۲۰۲۵) که بهبود آرایش بافتی کبد را در پاسخ به تمرین گزارش کردند، همخوانی دارد.

۴ بحث

پژوهش حاضر برای نخستین بار اثر هم افزای تمرین مقاومتی و آلیسین را بر مهار گلوکونئوزن کبدی از طریق تعدیل فسفوریلاسیون AKT و مهار FOXO1 در مدل موش های دیابتی نوع ۲ بررسی کرد. یافته های ما نشان داد که ترکیب این دو مداخله، نسبت به هر یک به تنهایی، کاهش بیشتری در گلوکز خون ناشتا، مقاومت انسولینی و بیان ژن های گلوکونئوزنیک ایجاد می کند. این اثر هم افزا با افزایش چشمگیر فسفوریلاسیون AKT و متعاقب آن افزایش فسفوریلاسیون FOXO1 در Ser256 همراه بود.

مسیر PI3K/AKT/FOXO1 یکی از مسیرهای مرکزی در تنظیم هموستاز گلوکز کبدی محسوب می شود. در شرایط مقاومت انسولینی، فسفوریلاسیون AKT کاهش یافته و FOXO1 فسفوریلاسیون نشده در هسته باقی می ماند و باعث افزایش رونویسی

PEPCK و G6Pase می‌شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که فعال‌سازی مسیر AKT از طریق مهار FOXO1، استراتژی مؤثری برای کاهش تولید گلوکز کبدی است.

تمرین مقاومتی از طریق مکانیسم‌های متعدد، سیگنالینگ انسولین را در کبد بهبود می‌بخشد. مطالعه‌ای نشان داد که ۸ هفته تمرین مقاومتی در موش‌های چاق، فسفوریلاسیون AKT را افزایش داده و بیان CDK4 و CDK6 را کاهش می‌دهد. همچنین، تمرین مقاومتی با کاهش بیان HNF-4 α ، PEPCK و G6Pase، تولید گلوکز کبدی را مهار می‌کند. مطالعه پیرا و همکاران (۲۰۲۶) نیز نشان داد که تمرین مقاومتی کوتاه‌مدت، فسفوریلاسیون FOXO1 کبدی را افزایش داده و محتوای PEPCK و G6Pase را کاهش می‌دهد.

آلیسین نیز به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال با خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی، مسیر PI3K/AKT را تعدیل می‌کند. مطالعه دنگ و همکاران (۲۰۲۵) نشان داد که مکمل‌سازی آلیسین، التهاب کبدی را کاهش داده و متابولیسم گلوکز را در موش‌های تغذیه‌شده با رژیم پرچرب/پرفروکتوز بهبود می‌بخشد. همچنین، آلیسین با تعدیل ژن ساعت‌زیستی Rev-erba و افزایش اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، هموستاز گلوکز را بهبود می‌دهد. مطالعه دیگری نشان داد که آلیسین با فعال‌سازی مسیر SIRT1/FOXO1، استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. نکته قابل توجه در پژوهش حاضر، اثر هم‌افزای ترکیب تمرین مقاومتی و آلیسین است. گروه ترکیبی افزایش معنی‌دارتری در نسبت p-AKT/t-AKT و p-FOXO1/FOXO1 نشان داد که با کاهش بیشتر بیان PEPCK و G6Pase همراه بود. این اثر هم‌افزا احتمالاً از طریق چندین مکانیسم توجیه‌پذیر است.

۱. تمرین مقاومتی با افزایش حساسیت انسولینی و بهبود سیگنالینگ AKT، بستر مولکولی مناسبی برای اثرات آلیسین فراهم می‌کند.

۲. آلیسین با مهار فسفاتاز PP2A که موجب دفسفوریلاسیون AKT می‌شود، می‌تواند سطح p-AKT را تثبیت کند.

۳. آلیسین با مهار DYRK1B که AKT-mediated FOXO1 phosphorylation را مهار می‌کند، می‌تواند اثر تمرین مقاومتی را در افزایش فسفوریلاسیون FOXO1 تقویت کند.

۴. هر دو مداخله با کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو، محیط کبدی را برای عملکرد بهینه مسیر AKT/FOXO1 مساعدتر می‌سازند.

۵ نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ترکیب تمرین مقاومتی و آلیسین از طریق تقویت هم‌افزای فسفوریلاسیون AKT و متعاقب آن افزایش فسفوریلاسیون و خروج هسته‌ای FOXO1، مهار مؤثرتری بر گلوکونئوژنز کبدی اعمال می‌کند. این رویکرد ترکیبی با کاهش معنی‌دار گلوکز خون ناشتا، مقاومت انسولینی و بیان ژن‌های کلیدی گلوکونئوژنیک (PEPCK و G6Pase) همراه بود. با توجه به ایمنی و هزینه‌پایین هر دو مداخله، این استراتژی ترکیبی می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد درمانی غیردارویی مؤثر و مکمل در مدیریت دیابت نوع ۲ و اختلالات متابولیک مرتبط مدنظر قرار گیرد.

منابع

1. Xu QG, Gu ZY, Chen WJ, Liu H, Li ZY, Cai WL, Huang J, Muhitdinov B, Liu EG, Aisa HA, Huang YZ. Transcutaneous allicin oleogel restores energy homeostasis for obesity treatment. *Acta Pharmacol Sin.* 2026 Aug;47(8):2282-2296. doi: 10.1038/s41401-026-01768-y. Epub 2026 Mar 30. PMID: 41912621; PMCID: PMC13389042. Novel mechanism of FOXO1 phosphorylation in glucagon signaling in control of glucose homeostasis. **2026.**
2. Wu Y, Pan Q, Yan H, Zhang K, Guo X, Xu Z, Yang W, Qi Y, Guo CA, Hornsby C, Zhang L, Zhou A, Li L, Chen Y, Zhang W, Sun Y, Zheng H, Wondisford F, He L, Guo S. Novel Mechanism of Foxo1 Phosphorylation in Glucagon Signaling in Control of Glucose Homeostasis. *Diabetes.* 2018 Nov;67(11):2167-2182. doi: 10.2337/db18-0674. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30201683; PMCID: PMC6198346.
3. Khamdan, M., & Bartelt, A. (2026). How oxidative stress leads to hepatic insulin resistance. *Immunity & Inflammation*, 2, Article 32.
4. Chen J, Liu Z, Gu J, Jiang Y, Cao K, Zhou N, Zhou Y, Wang Z, Zhou L, Yu J, Sun X, Li T, Zhang L, Huang T, Wang D, Zhang C, Tang K, Ma J, Zhang H, Lv J, Huang B. Revitalizing p-GSK-3 β via cysteine sulfenylation promotes hepatic insulin resistance by differentially regulating glycogenesis and gluconeogenesis. *Nat Metab.* 2026 May;8(5):1173-1188. doi: 10.1038/s42255-026-01507-x. Epub 2026 Apr 2. PMID: 41927796.
5. Muller GY, Matos FO, Perego Junior JE, Kurauti MA, Diaz Pedrosa MM. High-intensity interval resistance training (HIIRT) improves liver gluconeogenesis from lactate in Swiss mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2022 Apr;47(4):439-446. doi: 10.1139/apnm-2021-0721. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35020517.
6. Zolfaghari, A., Banaeifar, A., & Arshadi, S. (2026). The effect of a period of interval training on the expression of G6Pase and PEPCK genes in the liver tissue of obese type 2 diabetic rats. *Journal of Sports Physiology and Athletic Conditioning*, 6(19).
7. Li S, Huang K, Xu C, Zhang H, Wang X, Zhang R, Lu Y, Mohan M, Hu C. DYRK1B phosphorylates FOXO1 to promote hepatic gluconeogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2025 Apr 22;53(8):gkaf319. doi: 10.1093/nar/gkaf319. PMID: 40287828; PMCID: PMC12034038.
8. Miao Z, Liu Y, Xu Y, Bu J, Yang Q. Oxaloacetate promotes the transition from glycolysis to gluconeogenesis through the Akt-FoxO1 and JNK/c-Jun-FoxO1 axes and inhibits the survival of liver cancer cells. *Int Immunopharmacol.* 2025 Aug 28;161:115051. doi: 10.1016/j.intimp.2025.115051. Epub 2025 Jun 12. PMID: 40513330.
9. Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hishinuma T, Hashimoto S. Angiopoietin-related growth factor suppresses gluconeogenesis through the Akt/forkhead box class O1-dependent pathway in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Dec;323(3):787-93. doi: 10.1124/jpet.107.127530. Epub 2007 Sep 5. PMID: 17804676.
10. Gao YQ, Liu YB, Gao XF, Ren S, Tang S, Wang Z, Chen L, Hu JN, Cui JW, Li W. Ginsenoside Rh2 mitigates hepatic gluconeogenesis by regulating Akt/FoxO1 pathway in type 2 diabetic mice. *Int Immunopharmacol.* 2026 Jan 1;168(Pt 2):115927. doi: 10.1016/j.intimp.2025.115927. Epub 2025 Nov 22. PMID: 41275830.
11. Sharafifard, F., Kazeminasab, F., Ghanbari rad, M. et al. The combined effects of high-intensity interval training and time-restricted feeding on the AKT/FOXO1/PEPCK pathway in diabetic rats. *Sci Rep* 15, 13898 (2025).
12. Eizadi M, Salehi SS. Relationship between Changes in Serum Insulin with Hepatic Expression of PEPCK, G6Pase and HNF4 α in Response to Resistance Training in Diabetic Rats with High-Fat Diet and STZ. *Iran J Diabetes Obes.* **2025;** 17(1):40-47.

13. Ahmadian, A., Parsian, H., Hosseini, S. A., Soheili, S., & Ershadi, R. (2025). The effect of resistance training on hepatic FTO gene expression, fasting glucose and insulin resistance in Wistar rats with type 2 diabetes. *Pathobiology Research*, 28(1), 49–55.
14. da Costa Fernandes, C. J., da Cruz Rodrigues, V. C., de Sá Pereira, G. J., de Melo, D. G., de Campos, T. D. P., dos Santos Cancigliieri, R., da Silva, R. A. F., da Silva, A. S. R., Pauli, J. R., Gross, A., & de Moura, L. P. (2026). Epigenetically modulated MTCH2 and regulated ATP5 in the liver of obese mice subjected to strength training. *Life Sciences*, 384, 124105.
15. Pereira, R. M., da Cruz Rodrigues, K. C., Sant'Ana, M. R., da Rocha, A. L., Morelli, A. P., Veras, A. S. C., Gaspar, R. S., da Costa Fernandes, C. J., Teixeira, G. R., Simabuco, F. M., da Silva, A. S. R., Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Pauli, J. R., & de Moura, L. P. (2022). FOXO1 is downregulated in obese mice subjected to short-term strength training. *Journal of Cellular Physiology*, 237(11), 4262–4274.
16. Deng Y, Zhang Y, Xiao J, Cao Y, Ho CT, Lu M. Allicin Improves Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis and Gut Microbiota Dysbiosis in Mice via the Involvement of the Circadian Clock Gene Rev-erba. *J Agric Food Chem*. **2025**;73(15): 9019-9032.
17. Chauhan A, Dewali S, Pathak VM, Bisht SS, Chauhan R, Kaur D, Tuli HS, Haque S, Ahmad F. Therapeutic role of allicin in gastrointestinal cancers: mechanisms and safety aspects. *Discov Oncol*. 2025 Sep 26;16(1):1731. doi: 10.1007/s12672-025-02591-3. PMID: 41003866; PMCID: PMC12474849.
18. Wang Y, et al. Cobalt exposure increases fasting plasma glucose by inhibiting hepatic glycogen synthesis and enhancing gluconeogenesis via PI3K/Akt/FOXO1 pathway. *J Hazard Mater*. **2025**; 499:140132.
19. Liu, W., Meng, P., Li, Z., Shen, Y., Meng, X., Jin, S., & Hu, M. (2025). The multifaceted impact of physical exercise on FoxO signaling pathways. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 13, 1614732.
20. Naeimi, S., Hatami, M., & Gerdekaneh, M. K. (2025). Exercise-driven improvements in skeletal muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes: The role of AS160 phosphorylation and glucose transport machinery. *New Approaches in Exercise Physiology*, 7(13), e20046.
21. Montalvo, R. N., et al. (2025). Weightlifting outperforms voluntary wheel running for improving adiposity and insulin sensitivity in obese mice. *Journal of Sport and Health Science*.
22. Zhang, C., He, X., Sheng, Y., Xu, J., Yang, C., Zheng, S., Liu, J., Li, H., Ge, J., Yang, M., Zhai, B., Xu, W., Luo, Y., & Huang, K. (2020). Allicin regulates energy homeostasis through brown adipose tissue. *iScience*, 23(5), 101113.
23. Chen, K., Nakasone, Y., Yi, S., Ibrahim, H. R., Sakao, K., Hossain, M. A., & Hou, D.-X. (2022). Natural garlic organosulfur compounds prevent metabolic disorder of lipid and glucose by increasing gut commensal Bacteroides acidifaciens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(19), 5829–5837.
24. He, W., Kong, Z., Cai, J., Wang, Z., Ma, L., Xiao, X., & Luo, T. (2026). Alisol B 23-acetate alleviates high-fat diet-induced insulin resistance by activating the SIRT1/FOXO1 axis and PI3K/AKT pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 399(5), 6447–6466.
25. Ishiguro, H., Minato, K., Iwaasa, K., Wu, S., Antao, G., Tsuchida, T., Suwabe, T., Katagiri, T., Suzuki, H., Masuko, M., Watanabe, K.-I., Ushiki, T., & Sone, H. (2025). Combination of imeglimin and resistance exercise improves mitochondrial function and glucose metabolism in skeletal muscles. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 39(10), 109145.
26. Krassovskaia, P., Jevtovic, F., Zheng, D., Noone, J., Yeo, R. X., Pino, M. F., Stowe, C. L., Emilson, S. S., Musi, N., Huffman, K. M., Hebert, C., Bowen, S., Zarini, S., Ravussin, E., Broskey, N. T., Krauss, W. E., Bergman, B. C., Sparks, L. M., & Houmard, J. A. (2025). Effects of habitual endurance and resistance exercise on insulin action in primary human skeletal muscle stem cells. *Physiological Reports*, 13(19), e70600.

27. Zhou H, Yang J, Li N, Li J, Ran J, Zheng Y, Long Y, Cheng F, Liao Y. Impacts of resistance training combined with vibration training on the IGF-1/PI3K/AKT/FOXO3 axis and clinical outcomes in patients with sarcopenia: A protocol for a randomized controlled trial. PLoS One. 2025 Sep 26;20(9):e0333343. doi: 10.1371/journal.pone.0333343. PMID: 41004429; PMCID: PMC12468885.
28. Baik, S., Qianshi, Y., Park, S., Lee, H., Heo, H., Lee, J., Yuan, C., & Sung, J. (2025). Flavonoid derivatives isolated from *Hypericum monogynum* ameliorate insulin resistance via modulation of IRS-1/PI3K/Akt/FOXO1 pathway in HepG2 cells. *Journal of Medicinal Food*, 28(3), 243–255.
29. Xu Y, Yu J. Allicin Mitigates Diabetic Retinopathy in Rats by Activating Phosphatase and Tensin Homolog-induced Kinase 1/Parkin-mitophagy and Inhibiting Oxidative Stress-mediated NOD-like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome. *J Physiol Investig*. 2024 Jul 1;67(4):215-224. doi: 10.4103/ejpi.EJPI-D-24-00039. Epub 2024 Aug 29. PMID: 39206781.

Investigating the Synergistic Effects of Resistance Training and Allicin on the Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis Through Modulation of AKT Phosphorylation and Inhibition of the FOXO1 Transcription Factor

Danial Asadollahi Sohi ^{*1}, Bahareh Yazdanparast Chaharmahali ²

1- Senior expert in exercise physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Islamic Azad University, Tehran Branch

2 - Assistant Professor of exercise Physiology Department, Islamic Azad University, Varamin Branch

Abstract

Liver hyperactive gluconeogenesis is one of the major factors contributing to hyperglycemia in type 2 diabetes and metabolic syndrome. The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway plays an important role in suppressing the expression of gluconeogenic genes, including phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase, through phosphorylation of the Forkhead box O1 (FOXO1) transcription factor. In this study, 40 rats were randomly divided into five groups: healthy control, diabetic control, diabetic receiving resistance training, diabetic receiving allicin, and diabetic receiving combined resistance training and allicin. Type 2 diabetes was induced using a high-fat diet and streptozotocin injection. The training groups participated in an eight-week resistance training program, and allicin was administered daily. At the end of the intervention, liver tissue samples were collected to assess gene expression, protein levels, and histopathological changes. The results showed that resistance training alone increased protein kinase B phosphorylation and reduced the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase. Allicin also improved glucose metabolism and reduced hepatic inflammation. The combined intervention resulted in a greater increase in the ratio of phosphorylated protein kinase B to total protein kinase B and a more significant reduction in nuclear levels of Forkhead box O1 and the expression of gluconeogenic genes compared with either intervention alone. Furthermore, reductions in fasting blood glucose and insulin resistance were greater in the combined group. Overall, the combination of resistance training and allicin may, possibly through enhanced activation of protein kinase B and increased phosphorylation and nuclear export of Forkhead box O1, exert a more effective inhibitory effect on hepatic gluconeogenesis and may be considered a complementary non-pharmacological approach for the management of type 2 diabetes.

Keywords: Phosphorylation, lipid profile, hepatic gluconeogenesis, AKT, FOXO1, hepatic inflammation.

* Correspondence: daaniyaaaal76@gmail.com