

Effect of Medium-Chain Triglycerides on Gene Expression of ATP-Citrate Lyase and H3K27ac in Developing Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in an Animal Model

Monir Hassani Parvar¹,
Saeed Karima²,
Majid Sirati-Sabet³,
Afsaneh Goudarzi²

¹Master Student in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 21, 2021 ; Accepted October 28, 2021)

Abstract

Background and purpose: Increase in ATP-dependent Citrate Lyase (ACLY) is observed in individuals with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). One of the compounds considered for the prevention of fatty liver is Medium chain triglycerides (MCT). In this study, the preventive effect of MCT on ACLY enzyme gene expression and the level of histone 3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) were investigated in an animal model.

Materials and methods: In this study, 18 male Wistar rats were divided into three groups: control (n=6), fructose-fed (n=6), and fructose+MCT (n=6). Six weeks after the initiation of diets, the mice were sacrificed. ACLY gene expression was measured by Real-time qPCR. Also, H3K27 acetylation was investigated by western blotting. Data were analysed by one-way analysis of variance.

Results: The liver index in mice fed with fructose+MCT showed a significant increase compared to those fed with fructose alone (P<0.05). Accumulation of triglyceride droplets in the slides prepared from the fructose+MCT group did not show significant changes compared to the fructose fed group (P<0.05). Fructose increased ACLY gene expression, but the changes were not found to be significant in the fructose+MCT group compared to the controls and fructose-fed group (P<0.05). Fructose+MCT significantly reduced the amount of H3K27ac compared to the control and fructose-fed groups (P<0.05).

Conclusion: The study showed that MCT alongside fructose is ineffective at preventing the development of non-alcoholic fatty liver.

Keywords: non-alcoholic fatty liver, ATP-dependent citrate lyase enzyme, medium chain triglycerides, Histone acetylation

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (203): 11-22 (Persian).

* Corresponding Author: Afsaneh Goudarzi- School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: Afsaneh.goudarzi@sbmu.ac.ir)

تاثیر تری‌گلیسریدهای متوسط زنجیر بر میزان بیان ژن آنزیم سیترات لیاز وابسته به ATP و H3K27ac در ایجاد مدل حیوانی کبد چرب غیرالکلی

منیر حسنی پرور¹

سعید کریم²

مجید سیرتی ثابت³

افسانه گودرزی²

چکیده

سابقه و هدف: افزایش آنزیم سیترات لیاز وابسته به ATP (ACLY)، در افراد با کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) مشاهده شده است. یکی از ترکیباتی که امروزه جهت پیشگیری از کبد چرب مورد توجه قرار گرفته است، تاثیر تری گلیسریدهای متوسط زنجیر (MCT) می باشد. در این مطالعه تاثیر پیشگیرانه MCT بر روی تغییرات بیان ژن آنزیم ACLY و میزان استیلاسیون لیزین 27 هیستون 3 (H3K27ac) در مدل حیوانی بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه 18 سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار به سه گروه 6 تایی کنترل، تغذیه شده با رژیم فروکتوز و تغذیه شده با رژیم فروکتوز+MCT تقسیم شدند. پس از 6 هفته تغذیه با رژیم های ذکر شده، موش ها کشته شدند، بیان ژن آنزیم ATP سیترات لیاز با استفاده از روش Real-time qPCR ارزیابی شد. همچنین استیلاسیون H3K27 از طریق وسترن بلاتینگ بررسی شد. آنالیز واریانس یک طرفه با شرط $P < 0/05$ بکار گرفته شد.

یافته ها: ایندکس کبدی در موش های تغذیه شده با فروکتوز+MCT نسبت به گروه فروکتوز افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0/05$). میزان تجمعات قطرات تری گلیسرید در لام های تهیه شده از گروه تغذیه شده با فروکتوز+MCT نسبت به گروه تغذیه شده با فروکتوز تغییر چشمگیری نداشت. اگرچه فروکتوز بیان ژن ACLY را افزایش داد، اما تغییرات بیان ژن ACLY در گروه تغذیه شده با فروکتوز+MCT نسبت به گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز معنی دار نبود ($P < 0/05$). فروکتوز+MCT، میزان H3K27ac را نسبت به گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز به صورت معنی داری کاهش داد ($P < 0/05$).
استنتاج: براساس یافته های مطالعه حاضر استفاده از MCT به همراه فروکتوز در پیشگیری از ایجاد کبد چرب غیرالکلی بی تاثیر است.

واژه های کلیدی: کبد چرب غیرالکلی، آنزیم سیترات لیاز وابسته به ATP، تری گلیسریدهای متوسط زنجیر، استیلاسیون هیستون

مقدمه

کبد افرادی تعریف می شود که به وضوح بیماری کبدی ندارند و مصرف الکل روزانه شان کم تر از 30 و 20 گرم

کبد چرب غیرالکلی یا (NAFLD Nonalcoholic Fatty Liver Disease) به صورت تجمع لیپید اضافی در

E-mail: Afsaneh.goudarzi@sbums.ac.ir

مؤلف مسئول: افسانه گودرزی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

3. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1400/3/31 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/4/12 تاریخ تصویب: 1400/8/6

چربی در کبد افراد سالم (کنترل) مشاهده نشده است اما میزان بیان ژن‌های دخیل در لیپوژنز دنوو، 3 برابر میزان بیان این ژن‌ها در نمونه‌های کنترل (افراد سالم) است (16، 17). بنابراین این مسئله ما را به این مسیر سوق می‌دهد که افزایش لیپوژنز دنوو در هیپاتوسیت‌ها، منبع اصلی تجمع تری‌گلیسریدها در کبد و بروز NAFLD است. با توجه به اثبات تجربی تاثیر لیپوژنز دنوو در تجمع تری‌گلیسریدها در بیماران مبتلا به NAFLD، جهت پیدا کردن راه حلی برای پیشگیری و درمان این اختلال کبدی نیاز است که ترکیبات با پتانسیل درمانی بر این اختلال را از جهت تاثیر آن بر مسیر لیپوژنز دنوو بررسی کنیم. فروکتوز به‌عنوان اصلی‌ترین منبع تامین سوبسترای لیپوژنز دنوو شناخته شده است. فروکتوز پس از ورود به سلول‌های انتروسیت، هیپاتوسیت و سلول‌های توبولار کلیه شکسته شده و تریوز فسفات‌های دی‌هیدروکسی استون فسفات (DHAP) و گلیسرآلدئید 3-فسفات (GA3P) را تولید می‌کند. در ادامه GA3P می‌تواند سبب افزایش تولید اسید لاکتیک و افزایش گلوکونئوژنز شده و دی‌هیدروکسی استون فسفات نیز تولید گلیسرول 3-فسفات را افزایش می‌دهد (17). آنزیم ACLY یک آنزیم لیپوژنیک نوکلئوسیتوپلاسمی است که توانایی تولید استیل کوآ از سیترات را در هسته و سیتوپلاسم دارد (18). با توجه به اینکه لیپوژنز دنوو یک فرآیند شیمیایی سنتز اسیدهای چرب از استیل کوآ است، بنابراین مهار آنزیم ACLY می‌تواند نقش کلیدی در مهار پروسه لیپوژنز دنوو داشته باشد (19، 20). بررسی‌ها در مدل حیوانی رت نشان داده است که مهار آنزیم ACLY توسط هیدروکسی سیترات (HCA)، سنتز اسیدچرب، کلسترول و متعاقباً میزان تری‌گلیسرید و کلسترول پلاسما را به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد. همچنین پس از مهار این آنزیم توسط مهارکننده رقابتی کاهش چشمگیری در وزن رت‌ها مشاهده شده است. دست یافتن به این اطلاعات ما را به سمت این فرضیه سوق می‌دهد که احتمالاً مهار آنزیم ACLY بتواند به‌عنوان یک

به‌ترتیب در مردان و زنان است (1). به عبارت دیگر، NAFLD با تجمع مزمن لیپیدها (به خصوص تری‌گلیسریدها) که بیش‌تر از 5 تا 10 درصد از وزن کبد را در غیاب مصرف الکل اضافی تشکیل می‌دهد، مشخص می‌شود و به آسیب کبدی اشاره دارد که در انواع مختلفی از کبد چرب ساده تا سیروز پیشرونده دیده می‌شود (4-2). این بیماری به‌طور تیبیک بدون علامت و حتی ممکن است خوش‌خیم بوده و با کاهش وزن و ورزش برگشت‌پذیر باشد (5، 6)، اما در 20 درصد افراد مبتلا شده یک استئاتوزیز ساده کبدی می‌تواند منجر به یک فرم شدید بیماری به نام NASH (Nonalcoholic steatohepatitis) شود (9-6). لیپیدهای کبدی ممکن است از طریق مواد غذایی، استریفیکاسیون اسیدهای چرب آزاد پلاسما (FFA) یا فرایند لیپوژنز دنوو هیپاتوسیتی (De novo lipogenesis: DNL) حاصل شود. تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که عامل اصلی در ایجاد کبد چرب غیرالکلی فرآیند DNL است و دو عامل دیگر نقش اساسی ندارند (5، 10، 11). مشخصه NAFLD تجمع تری‌گلیسرید در سیتوپلاسم هیپاتوسیت‌ها است که ناشی از عدم تعادل بین مقدار دریافتی (برداشت اسیدهای چرب و لیپوژنز دنوو) و مصرفی (اکسیداسیون میتوکندریایی اسید چرب و خروج به عنوان جزئی از ذره VLDL) تری‌گلیسرید است. NAFLD اغلب با چاقی و دیابت نوع دو (T2DM) به این علت که ویژگی‌های مشابه سندروم متابولیک مانند التهاب و مقاومت به انسولین را دارند، در ارتباط است (15-12). تحقیقات تجربی ثابت کرده‌اند که تری‌گلیسریدهای تجمع یافته در کبد افراد مبتلا به NAFLD از 3 منبع سرچشمه می‌گیرند: 59 درصد از تری‌گلیسریدهای داخل کبدی از اسید چرب در حال گردش، 26 درصد از لیپوژنز دنوو و 15 درصد از چربی مواد غذایی مشتق می‌شود (16، 17). اگرچه تفاوت معنی‌داری بین میزان اسیدچرب آزاد شده از بافت چربی در کبد بیماران مبتلا به NAFLD با میزان اسید چرب آزاد شده از بافت

اسیدچرب با طول 6 تا 12 اتم کربن هستند (29,28). اسید کاپروئیک با 6 اتم کربن، اسید کاپریلیک با 8 اتم کربن، اسید کاپریک با 10 اتم کربن، اسید لوریک با 12 اتم کربن از انواع MCT هستند (30). امروزه از روغن MCT جهت پیشگیری از برخی اختلالات متابولیکی و التهابی مزمن مانند مقاومت به انسولین و چاقی استفاده می‌شود. همچنین به دلیل سرعت بالای جذب و اکسیداسیون این ترکیبات می‌توان از آن‌ها در تغذیه تزریقی بیماران (افرادی که امکان تغذیه دهانی ندارند) استفاده کرد (31). مطالعات در سال‌های اخیر نشان داده است که مصرف ترکیبات MCT در انسان می‌تواند سبب افزایش مصرف انرژی، افزایش سیری و در نهایت تغییر ترکیبات بدن و کاهش وزن بدن شود. اثر MCT بر روی میزان تجمع چربی در کبد (استئاتوز) و مقدار تری‌گلیسرید و کلسترول کبدی در بازه‌های زمانی مختلف، متفاوت و همچنان قابل بحث است (29). همچنین، با توجه به یافته‌های مختلف، تجویز MCT به منظور کاهش وزن در انسان متفاوت است (29). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که از MCT به مدت 8 هفته به منظور پیشگیری از کبد چرب استفاده شده بود، اثرات حفاظتی MCT با بهبود پروفایل لیپیدی سرم، کاهش کلسترول تام کبدی و کاهش وزن بدن مشاهده شد (32). در حالی که برخی مطالعات دیگر نشان داده‌اند که مصرف طولانی مدت MCT با دوز بالا علی‌رغم کاهش تجمع چربی بدن و مقاومت به انسولین، اثرات مخربی روی کبد داشته است. به طور مثال، تجویز MCT به همراه فروکتوز به مدت 12 هفته (مدت طولانی) سبب افزایش تری‌گلیسرید و کلسترول کبدی و استئاتوز شده است (29,31). با توجه به مطالبی که بیان شد و عدم درمان قطعی و مشخص برای کبد چرب و تناقض‌های مشاهده شده در ارتباط با مصرف MCT، یافتن راه حلی جهت پیشگیری از کبد چرب و شواهدی در ارتباط با آشکار ساختن نقش حفاظتی و یا مضر MCT به همراه فروکتوز بسیار ضروری است. بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی

هدف پیشگیری و درمانی برای کبد چرب، دیس لیپیدمیا و چاقی در نظر گرفته شود (21-23). به عنوان مثال در تحقیقات تجربی که موش‌ها در دو گروه با رژیم پرچرب و کم چرب تغذیه شده بودند، Knock down آنزیم ACYL توسط آدنوویروس‌ها، مقدار استیل کوآ و مالونیل کوآی (مقدار این محصولات توسط روش HPLC اندازه گیری شدند) هپاتوسیت‌ها (در هر دو گروه رژیم کم چرب و پرچرب) و به دنبال آن سطح تری‌گلیسرید و اسیدچرب آزاد (به دلیل کاهش لیپوژنز دنوو) را به‌طور چشمگیری کاهش داد (19). امروزه فروکتوز به عنوان قند لیپوژنیک شناخته شده است و تجزیه آن منجر به تولید متابولیت‌های DHAP و GA3P می‌شود که متابولیت‌های ذکر شده سبب تحریک فاکتورهای رونویسی SREBPc1¹ و ChREBP² می‌شود. SREBPc1 و ChREBP بیان ژن آنزیم‌های دخیل در لیپوژنز دنوو که شامل ACACA⁴، FASN³، ACYL و آسیل ترانسفرازها هستند را افزایش می‌دهد و همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد ACYL با افزایش تولید استیل کوآنزیم آ در سیتوپلاسم و هسته به ترتیب تولید اسیدهای چرب و احتمالاً استیلاسیون هیستون (H3K27ac) را افزایش می‌دهد (17). در پاسخ به مصرف کربوهیدرات، افزایش بیان آنزیم ACYL از طریق تولید بیش‌تر استیل کوآ، سنتز لیپید و استیلاسیون هیستون‌ها را میانجی‌گری کرده و در نتیجه میزان بیان ژن‌های دخیل در گلوکونوژنز و لیپوژنز دنوو نیز افزایش می‌یابد (17,24,25). در آرابیدوپسیس نشان داده شده است که افزایش استیلاسیون لیزین 27 هیستون H3 (H3K27ac) وابسته به ACYL و هیستون استیل ترانسفراز GCN5 است (26). همچنین نشان داده شده است که هدف قراردادن ACYL در *in vivo* و *in vitro* استیلاسیون لیزین 27 هیستون H3 (H3K27ac) را کاهش می‌دهد (27). تری‌گلیسریدهای متوسط زنجیر (MCT) شامل یک اسکلت گلیسرولی و سه زنجیره

1. Sterol regulatory element-binding protein c1
2. Carbohydrate response element binding protein
3. Fatty Acid Synthase
4. Acetyl-CoA Carboxylase Alpha

جراحی انجام شد. سپس با سرم فیزیولوژی عمل پرفیوژن انجام شد و بافت کبد حیوان استخراج گردید. بافت کبد بلافاصله وزن شد و پس از آن به 3 قسمت تقسیم شد. بخش اول داخل فالکون حاوی فرمالین 10 درصد قرار گرفت. بخش دوم و سوم جهت استخراج RNA و پروتئین، به فریزر -80 درجه سانتی گراد منتقل شدند.

ارزیابی ایندکس کبدی

ایندکس کبدی شاخصی از میزان استئاتوز کبدی است که به صورت نسبت وزن کبد به وزن موش $\times 100$ محاسبه می شود. جهت محاسبه ایندکس کبدی در طی 6 هفته ای که رت ها تغذیه شدند، هفته ای یک مرتبه (آخر هفته) وزن کشتی شدند. در هفته ششم پس از کشتن رت ها وزن کبد آن ها اندازه گیری شد. لازم به ذکر است که به هنگام محاسبه ایندکس کبدی، وزن هفته آخر از وزن هفته اول کم شد (به این عمل $\text{total body weight increment}$ گفته می شود) و سپس طبق فرمول وزن کبد رت ها بر وزن به دست آمده تقسیم و در 100 ضرب شد.

ارزیابی هیستوپاتولوژی

بافت های کبدی داخل فرمالین فیکس و در پارافین قالب گیری شدند، سپس برش های بافتی با ضخامت 5 میکرون تهیه و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد (34). برش بافتی بر روی لام فیکس شد و دو مرتبه در زایلول، هر بار به مدت 10 دقیقه برای پارافین زدایی، قرار داده شد. سپس لام، در سیر نزولی الکل شامل اتانول مطلق، اتانول 96 درصد، اتانول 70 درصد و آب مقطر، هر کدام به مدت 5 دقیقه به منظور آبدهی، قرار گرفت. لام آبدهی شده، در رنگ آمیزی هماتوکسیلین، به مدت 6 دقیقه برای رنگ آمیزی هسته، قرار داده شد. سپس در آب جاری، به مدت 5 دقیقه برای شست و شو، قرار گرفت. سپس لام در رنگ ائوزین به مدت 3 دقیقه جهت رنگ آمیزی سیتوپلاسم، قرار داده شد. فرآیند آب گیری با استفاده از سیر صعودی الکل شامل اتانول

تاثیر پیشگیرانه MCT به همراه فروکتوز بر روی تغییرات بیان آنزیم لیپوژنیک ACLY و میزان H3K27ac در مدل حیوانی است.

مواد و روش ها

گروه بندی تحقیق

18 سر رت نر به صورت تصادفی، به 3 گروه 6 تایی تقسیم و در قفس های پلی استیرین قرار گرفتند. اصول نگهداری این حیوانات بر اساس قوانین بین المللی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و به تصویب کمیته اخلاق (IR.SBMU.MSP.REC.1399.314) دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید. گروه ها شامل، گروه 1 (شاهد سالم)، گروه 2 (تغذیه با رژیم غنی از فروکتوز) و گروه 3 (تغذیه با رژیم غنی از فروکتوز به همراه تیمار با MCT) یا گروه پیشگیری از کبد چرب بود.

روش القای کبد چرب غیر الکلی

طبق مطالعات، حدود مدت زمان مورد نیاز برای القای کبد چرب در مدل موش های صحرایی، به مدت 5 هفته می باشد (33). میزان مصرفی روغن MCT با مشاوره یک متخصص تغذیه، در گروه های پیشگیری به میزان 35 درصد انرژی روزانه محاسبه شد. روغن به صورت گاواژ به رت ها داده شد. رت ها تقریباً 15 گرم در روز خوراک مصرف می کنند. بنابراین با محاسبه انرژی 15 گرم خوراک بر اساس جدول رژیم غذایی، مقدار انرژی کل در 15 گرم از رژیم محاسبه شد. سپس با محاسبه 35 درصد انرژی روزانه، میزان مصرف روغن MCT، $2/22$ میلی لیتر برآورد شد.

جمع آوری نمونه

در پایان دوره، برای جراحی، رت ها به مدت 8 ساعت در حالت ناشتا قرار گرفتند. سپس به وسیله کتامین زایلازین بیهوش شدند (لازم به ذکر است که قبل از کشتن رت ها وزن آن ها ثبت شد). پس از بیهوشی کامل،

Real time-qPCR

بیان ژن ACLY با استفاده از مستر میکس سایبرگرین Ampliqon و روش RT-qPCR اندازه‌گیری شد (35). توالی پرایمرها در جدول شماره 1 ارائه شده است. برنامه RT-qPCR شامل سیکل اول: 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، سیکل دوم: 15 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، سیکل سوم: 20 ثانیه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد و سیکل چهارم: 25 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد (سیکل‌های دوم تا چهارم 40 مرتبه تکرار شدند). از بتا 2 میکروگلوبولین (B2M) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. جهت کمی‌سازی بیان نسبی ژن ACLY از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

جدول شماره 1: توالی و خصوصیات پرایمرها

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	طول محصول
ACLY	F: ACCCAGAGGAAGCCTACATTGC	22	169
	R: TTCGCCAGTTCGTTGACACC	20	
B2M	F: TGCTTGCCATTTCAGAAAACCTCC	22	111
	R: TTTGAGGTGGGTGGAAGTCTGAG	21	

وسترن بلائینگ

استخراج هیستون‌ها

به منظور بررسی میزان H3K27ac، 100 میلی‌گرم از بافت کبد توسط ترازو وزن شد و پس از آن داخل هموژنایزر در حالی که 500 میکرولیتر بافر لیز RIPA به همراه مهارکننده پروتئاز اضافه شده بود، هموژن شد. محلول به دست آمده پس از هموژن کردن بافت، 3 مرتبه با زمان‌های 20 ثانیه، 15 ثانیه و 10 ثانیه با استفاده از دستگاه سونیکاتور، سونیکیت شد. سپس، هموژن به دست آمده به مدت 15 الی 20 دقیقه روی یخ نگه داشته شد. بعد از طی این زمان پروتئین تام توسط یک لایه گاز استریل صاف شد و در دور 1000 g به مدت 4 دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ با 100 μ l از بافر لیز RIPA شسته شد. 200 μ l از H₂SO₄ با غلظت 0/2 مولار به بافت هموژن شده اضافه شد و به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار گرفت. سپس به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد

70 درصد، اتانول 96 درصد و اتانول مطلق، هر کدام به مدت 1 دقیقه انجام شد. لام دو مرتبه در زایلول برای شفاف‌سازی، هر بار به مدت 5 دقیقه قرار گرفت. در نهایت بر روی لام کمی اتانل ریخته و بر روی قسمت برش بافت، لامل قرار داده شد. لام‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری از نظر رسوب چربی بررسی شدند.

نحوه اندازه‌گیری بیان ژن

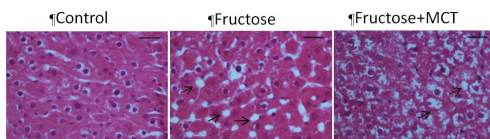
استخراج RNA

استخراج RNA از بافت کبد توسط کیت ViraGene انجام شد. بدین منظور، ابتدا به میزان حداکثر 10 میلی‌گرم از بافت کبد برداشته شد و 400 میکرولیتر از Cell Lysis Buffer به بافت اضافه و سپس با سرنگ هموژن شد. میکروتیوب حاوی هموژن بافت کبدی، به مدت 2 دقیقه با دور 12000 rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت به میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتر RNase free، دیگری اضافه شد. به ازای نصف حجم آن الکل مطلق اضافه شد. 600 میکرولیتر از این مخلوط برداشته و به ستون استخراج، اضافه شد. ستون استخراج، به مدت 30 ثانیه با دور 12000 rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. سپس مایع جمع شده در زیر ستون استخراج، دور ریخته و ستون با Wash Solution A و Wash Solution B شستشو شد. سپس ستون استخراج در یک میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتر RNase free دیگری، قرار داده شد. به ستون 100-50 میکرولیتر از Elution Buffer اضافه شد. ستون به مدت 1 دقیقه با دور 12000 rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع زیر ستون استخراج، حاوی RNA می‌باشد. برای بررسی خلوص RNA استخراج شده جهت نشان دادن حضور RNA آلودگی احتمالی با DNA و پروتئین از نسبت جذب 260/280 و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از 1 میکروگرم RNA، طبق پروتکل کیت Solis BioDyne انجام شد.

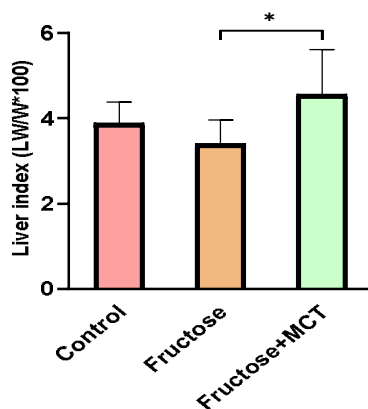
یافته ها

- یافته های ایندکس کبدی

لام های تهیه شده از بافت های کبد و رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین تجمع تری گلیسرید را در گروه تغذیه شده با فروکتوز و فروکتوز +MCT نشان داد، در حالی که در گروه کنترل تجمع قطرات تری گلیسرید مشاهده نشد (تصویر شماره 1). ایندکس کبدی رت هایی که با فروکتوز +MCT در فاز پیش گیری تغذیه شده بودند نسبت به گروه تغذیه شده با فروکتوز افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$)، حال آن که انتظار می رفت میزان ایندکس کبدی پس از مصرف MCT با فروکتوز (پیشگیری از NAFLD) کاهش یابد (نمودار شماره 1).



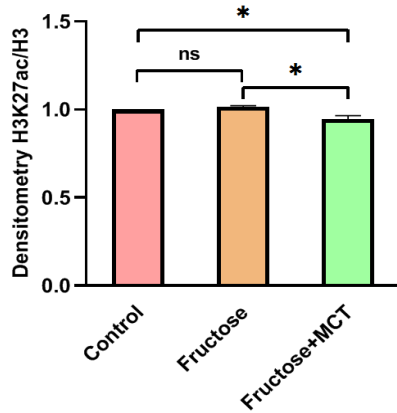
تصویر شماره 1: مقایسه استاتوز کبدی بین گروه های کنترل، فروکتوز و فروکتوز +MCT با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین. حباب های سفید، لیپیدها هستند که با پیکان نشان داده شده اند (بزرگ نمایی 40X). Scale bar: 10µm.



نمودار شماره 1: مقایسه تغییرات ایندکس کبدی بین گروه های کنترل (n=6)، فروکتوز (n=6) و فروکتوز +MCT (n=6). نمودار بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است $p < 0/05$ *

در دور 1200 g سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا شد و 20TCA درصد جهت رسوب پروتئین ها به صورت قطره قطره به آن اضافه شد. سپس، 30 دقیقه روی یخ نگه داشته شد تا تمام پروتئین ها رسوب کنند. میکروتیوب در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه در دور 16000 g سانتریفیوژ و رسوب آن توسط مخلوط 0/1 Aceton/HCl درصد شسته شد. در انتها، پس از خالی کردن محلول شستشو، بر روی رسوب به دست آمده 30 µl اوره 8 مولار اضافه گردید. هیستون های استخراج شده تا زمان استفاده در 20- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (34). به منظور مطالعه H3K27ac، وسترن بلات انجام شد. 20 میکروگرم هیستون استخراج شده از نمونه های مربوط به گروه های کنترل، تغذیه شده با فروکتوز، تغذیه شده با فروکتوز +MCT الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز ژل از تانک خارج و پروتئین ها بر روی غشای نیتروسولوز منتقل شدند. سپس بسته به آنتی بادی مورد استفاده، غشا توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) یا شیر خشک بدون چربی (Skimmed Milk) بلاک شد. 3 میلی لیتر از آنتی بادی اولیه (H3K27ac) رقیق شده در Milk 5 درصد یا BSA 5 درصد (سته به نوع آنتی بادی) تهیه گردید و داخل ظرف ریخته شد و سپس ظرف حاوی غشا و آنتی بادی اولیه رقیق شده در Cold chamber دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت یک شب (overnight) بر روی stirrer قرار داده شد. سپس 3 میلی لیتر از آنتی بادی ثانویه رقیق شده (حاوی 3 میکرو لیتر از Anti-Rabbit به عنوان آنتی بادی ثانویه در 3 میلی لیتر Blocking) اضافه شد و غشا به مدت 45 دقیقه بر روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفت. سپس آنتی بادی ثانویه برداشته شد و غشا در 3 مرحله، هر بار به مدت 10 دقیقه با TBS-T شست و شو داده شد. ECL بر روی غشا ریخته شد و سیگنال به دست آمده بر روی فیلم رادیوگرافی ظاهر شد (34). از آنتی بادی H3 به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

را نسبت به گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز به‌طور معنی‌دار کاهش داد ($P < 0/05$). تفاوت معنی‌داری بین H3K27ac در گروه کنترل و تغذیه شده با فروکتوز مشاهده نشد.



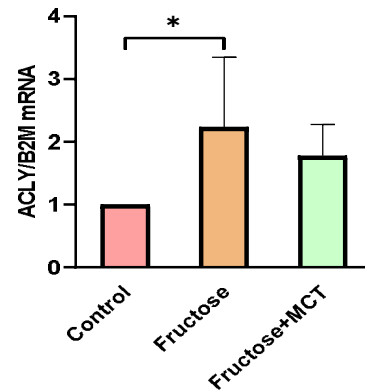
نمودار شماره 3: آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی H3K27ac و هیستون های استخراج شده از بافت کبد گروه های کنترل، فروکتوز و فروکتوز + MCT.

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی میزان تاثیرگذاری MCT به همراه فروکتوز در ایجاد NAFLD بود. بدین منظور در یک گروه از رت‌ها با استفاده از فروکتوز، مدل NAFLD ایجاد شد و گروه دیگر رت‌ها با فروکتوز و MCT به مدت 6 هفته تغذیه شدند (33) تا اثر MCT به همراه فروکتوز در ایجاد NAFLD بررسی شود. نتایج به‌دست آمده از مطالعه

- یافته‌های بیان ژن *ACLY*

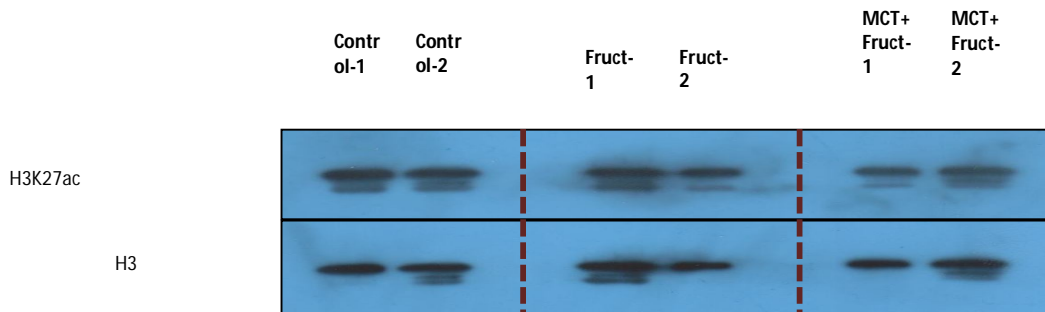
اندازه‌گیری بیان ژن *ACLY* در بافت کبد سه گروه رت (کنترل، تغذیه شده با فروکتوز، تغذیه شده با فروکتوز+MCT) صورت گرفت که با نرمال‌سازی داده‌ها به‌وسیله میزان بیان ژن بتا 2 میکروگلوبولین (B2M) به میزان واقعی بیان ژن مورد نظر دست یافتیم. بیان ژن *ACLY* در نمودار شماره 2 نشان داده است. بیان ژن *ACLY* در گروه فروکتوز نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$).



نمودار شماره 2: مقایسه تغییرات بیان ژن *ACLY* بین گروه‌های کنترل (n=5)، فروکتوز (n=5) و فروکتوز+MCT (n=5). نمودار بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است $P < 0/05$ *

- یافته‌های تغییرات *H3K27ac*

همان‌طور که نتایج در نمودار شماره 3 و تصویر شماره 2 نشان می‌دهد فروکتوز + MCT میزان *H3K27ac*



تصویر شماره 2: مقایسه تغییرات دانسیته *H3K27ac* بین گروه‌های کنترل (n=3)، فروکتوز (n=3) و فروکتوز + MCT (n=3). دانسیته *H3K27ac* با نرم افزار Image J اندازه‌گیری و نمودار بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است $P < 0/05$ *

القای استیلاسیون هیستون باشد، به طور مثال آنزیم Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2 (ACSS2) سنتز استیل کوآ از استات را با استفاده از ATP کاتالیز می کند. ACSS2 به عنوان تنظیم کننده استیلاسیون هیستون از طریق بازیافت استات به استیل کوآ و به کارگیری هیستون استیل ترانسفرازهای CBP/p300 شناخته شده است (38). مطالعه Zhao و همکارانش در سال 2020 افزایش بیان ACSS2 در پاسخ به مصرف فروکتوز را نشان داده است (39) و تاکنون مطالعه‌ای به بررسی تاثیر MCT به همراه فروکتوز بر میزان بیان ACSS2 نپرداخته است. بنابراین، بررسی بیان ACSS2 در گروه‌های مورد آزمایش و مصرف MCT به تنهایی که در این مطالعه میسر نشد، می تواند مکانیسم کاهش استیلاسیون به واسطه مصرف هم‌زمان فروکتوز و MCT را روشن سازد.

به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده بی تاثیر بودن مصرف MCT به همراه فروکتوز در پیشگیری از ایجاد کبد چرب غیرالکلی است.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر اندازه گیری فعالیت آنزیم ACLY و بررسی پروتئین آن با روش وسترن بلائینگ است که پیشنهاد میشود در پژوهش‌های آینده مورد بررسی قرار گیرند. با توجه به این که مطالعات طراحی شده کافی برای بررسی اثر هم‌زمان MCT و فروکتوز در ایجاد کبد چرب غیرالکلی با تمرکز بر بیان ژن آنزیم‌های دخیل در فرآیند لیپوزنز و استیلاسیون هیستون در دسترس نمی باشد، نتایج قابل مقایسه با یافته‌های این پژوهش محدود بود.

سپاسگزاری

از تمامی عزیزانی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند کمال سپاسگزاری را داریم. مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه دانشجویی خانم منیر حسینی پرور با شماره ثبت 149 در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است.

حاضر حاکی از افزایش ایندکس و استئاتوزیز کبدی پس از مصرف MCT به همراه فروکتوز در بازه زمانی 6 هفته بود، اگرچه فروکتوز نیز به تنهایی در بازه زمانی ذکر شده تجمع قطرات لیپیدی را نشان داد، اما افزایش ایندکس کبدی در این گروه از رت‌ها مشاهده نشد. به عبارتی به نظر می رسد مصرف MCT سبب تشدید اثرات فروکتوز در ایجاد NAFLD شده است. مطالعه Guimarães و همکارانش در سال 2019 نشان داد تجویز MCT به همراه فروکتوز به مدت 12 هفته (مدت طولانی) در موش‌های C57bl/6 سبب افزایش تری گلیسرید، کلسترول کبدی و استئاتوزیز می شود (29). یافته‌های مطالعه حاضر نیز نشان داد که مصرف 6 هفته‌ای MCT به همراه فروکتوز، اثرات فروکتوز در تجمع تری گلیسرید را معکوس نکرده است و کبد چرب غیرالکلی ایجاد شده است، لذا تاییدی بر اثرات غیر حفاظتی MCT به همراه فروکتوز فراهم آورد. مصرف فروکتوز از طریق افزایش بیان آنزیم ACLY با تولید استیل کوآ که می تواند به مالونیل کوآ و دیگر آسیل کوآهای کوتاه زنجیر تبدیل و برای سنتز لیپیدها در سیتوزول استفاده شود در ایجاد NAFLD موثر است (20، 36، 37). رت‌های تغذیه شده با فروکتوز افزایش بیان ACLY را مشابه با مطالعه Softic و همکارانش نشان دادند (37). MCT به همراه فروکتوز بر میزان بیان ACLY بی تاثیر بود اما میزان استیلاسیون لیزین 27 هیستون را به طور معنی داری نسبت به گروه تغذیه شده با فروکتوز و کنترل کاهش داد. اگرچه مصرف فروکتوز به تنهایی افزایش بیان ACLY را به همراه داشت اما میزان H3K27ac از افزایش ACLY بی تاثیر بود حال آن که مطالعه پیشین توسط Chen و همکاران در سال 2017 القای H3K27ac تحت تاثیر افزایش ACLY را نشان داده است (26). احتمال می رود میزان افزایش یافته ACLY به واسطه مصرف فروکتوز در مطالعه حاضر برای ایجاد تغییرات در H3K27ac کافی نبوده باشد و اثرات MCT به همراه فروکتوز بر کاهش میزان H3K27ac ناشی از تغییرات بیان آنزیم‌های دیگر دخیل در

References

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2012; 55(6): 2005-2023.
2. Bagci R, Sahinturk V, Sahin E. Azoramide ameliorates fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Tissue cell* 2019; 59: 62-69.
3. Germani G, Becchetti C. Liver transplantation for non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva gastroenterologica e dietologica* 2018; 64(2): 138-146.
4. Mikolasevic I, Filipec-Kanizaj T, Mijic M, Jakopic I, Milic S, Hrstic I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation-Where do we stand? *World J Gastroenterol* 2018; 24(14): 1491-1506.
5. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61(5): 1282-1293.
6. Paglialunga S, Dehn CA. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids in health and disease* 2016; 15(1): 159.
7. Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, Chan HY, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 2010; 59(7): 969-974.
8. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol* 2015; 62(5): 1148-1155.
9. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol* 2013; 59(3): 550-556.
10. Diraison F, Beylot M. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *Am J Physiol* 1998; 274(2): E321-327.
11. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 726-735.
12. Chen G, Ni Y, Nagata N, Xu L, Ota T. Micronutrient Antioxidants and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): 1379.
13. Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules* 2015; 5(3): 1563-1579.
14. Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *Jama* 2003; 289(22): 3000-3004.
15. Fan JG, Li F, Cai XB, Peng YD, Ao QH, Gao Y. Effects of nonalcoholic fatty liver disease on the development of metabolic disorders. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(7): 1086-1091.
16. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via

- lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115(5): 1343-1351.
17. ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* 2017; 9(9): 981.
 18. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Acetyl-CoA-directed gene transcription in cancer cells. *Genes & Dev* 2018; 32(7-8): 463-465.
 19. Wang Q, Li S, Jiang L, Zhou Y, Li Z, Shao M, et al. Deficiency in hepatic ATP-citrate lyase affects VLDL-triglyceride mobilization and liver fatty acid composition in mice. *J Lipid Res* 2010; 51(9): 2516-2526.
 20. Wang Q, Jiang L, Wang J, Li S, Yu Y, You J, et al. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2009; 49(4): 1166-1175.
 21. Ma Z, Chu CH, Cheng D. A novel direct homogeneous assay for ATP citrate lyase. *J Lipid Res* 2009; 50(10): 2131-2135.
 22. Sullivan AC, Triscari J, Hamilton JG, Miller ON, Wheatley VR. Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat. I. Lipogenesis. *Lipids* 1974; 9(2): 121-128.
 23. Sullivan AC, Hamilton JG, Miller ON, Wheatley VR. Inhibition of lipogenesis in rat liver by (-)-hydroxycitrate. *Arch Biochem Biophys* 1972; 150(1): 183-190.
 24. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science (New York, NY)*. 2009; 324(5930): 1076-1080.
 25. Fernandez S, Viola JM, Torres A, Wallace M, Trefely S, Zhao S, et al. Adipocyte ACLY Facilitates Dietary Carbohydrate Handling to Maintain Metabolic Homeostasis in Females. *Cell Rep* 2019; 27(9): 2772-2784.e6.
 26. Chen C, Li C, Wang Y, Renaud J, Tian G, Kambhampati S, et al. Cytosolic acetyl-CoA promotes histone acetylation predominantly at H3K27 in Arabidopsis. *Nat Plants* 2017; 3(10): 814-824.
 27. Carrer A, Parris JLD, Trefely S, Henry RA, Montgomery DC, Torres A, et al. Impact of a High-fat Diet on Tissue Acyl-CoA and Histone Acetylation Levels. *J Biol Chem* 2017; 292(8): 3312-3322.
 28. Bach AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr* 1982; 36(5): 950-962.
 29. Guimarães J, Bargut TCL, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2019; 140: 64-71.
 30. McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA, et al. Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. *Cell Rep* 2016; 17(6): 1463-1472.
 31. Chamma CM, Bargut TC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. A rich medium-chain triacylglycerol diet benefits adiposity but has adverse effects on the markers of hepatic lipogenesis and beta-oxidation. *Food & function* 2017; 8(2): 778-787.
 32. Sung MH, Liao FH, Chien YW. Medium-Chain Triglycerides Lower Blood Lipids and Body Weight in Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes Rats. *Nutrients* 2018; 10(8): 963.
 33. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, et al. Rats fed

- fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr* 2009; 139(11): 2067-2071.
34. Goudarzi A, Hosseinmardi N, Salami S, Mehdikhani F, Derakhshan S, Aminishakib P. Starvation promotes histone lysine butyrylation in the liver of male but not female mice. *Gene* 2020; 745: 144647.
35. Ebrahimi R, Toolabi K, Jannat Ali Pour N, Mohassel Azadi S, Bahirae A, Zamani-Garmsiri F, et al. Adipose tissue gene expression of long non-coding RNAs; MALAT1, TUG1 in obesity: is it associated with metabolic profile and lipid homeostasis-related genes expression? *Diabetology & metabolic syndrome* 2020; 12(36): 1-13.
36. Roeb E, Weiskirchen R. Fructose and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Front. Pharmacol* 2021; 12: 634344.
37. Softic S, Gupta MK, Wang GX, Fujisaka S, O'Neill BT, Rao TN, et al. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. *J Clin Invest* 2017; 127(11): 4059-4074.
38. Huang Z, Zhang M, Plec AA, Estill SJ, Cai L, Repa JJ, et al. ACSS2 promotes systemic fat storage and utilization through selective regulation of genes involved in lipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(40): E9499-e9506.
39. Zhao S, Jang C, Liu J, Uehara K, Gilbert M, Izzo L, et al. Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature* 2020; 579(7800): 586-591.