

Research Paper

The Effect of Eight Weeks Endurance Training, Somatropin Injection, and Its Lipolytic Fragment (AOD9604) on Cytokeratin-18 and Liver Enzymes of Mice Induced Liver Damage Due to a High-Fat Diet



Mohsen Dehbashi¹ *Mehrdad Fathi¹ Seyed Reza Attarzadeh Hosseini¹ Mohammad Mosaferi Ziaaldini¹

1. Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.



Citation Dehbashi M, Fathi M, Attarzadeh Hosseini SR, Mosaferi Ziaaldini M. [The Effect of Eight Weeks Endurance Training, Somatropin Injection, and Its Lipolytic Fragment (AOD9604) on Cytokeratin-18 and Liver Enzymes of Mice Induced Liver Damage Due to a High-Fat Diet (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(4):502-517. <https://doi.org/10.32598/hms.27.4.3513.1>

<https://doi.org/10.32598/hms.27.4.3513.1>



Received: 01 Des 2020

Accepted: 17 Feb 2021

Available Online: 01 Oct 2021

ABSTRACT

Aims Fatty liver and its treatment are among the concerns of today's society. So this study aimed to investigate the effect of endurance training, Somatropin injection, and its lipolytic fragment (AOD9604) on cytokeratin-18 (CK18) levels and liver enzymes of mice with fatty liver.

Methods & Materials In this experimental study, 28 male mice were randomly divided into four groups (7 mice in every group): Control (C), exercise (E), exercise + fragment (EA), and exercise + growth hormone (EGH). A medium-intensity endurance training program was performed for 8 weeks, 5 sessions per week with an intensity of 50% VO₂max. The somatropin and fragment injection protocols were 1 mg and 250 mc/kg of body weight, respectively. The mice were evaluated 48 hours after the last training session. The obtained data were analyzed using 1-way ANOVA and post hoc Tukey tests at the significant level of P<0.05 in SPSS version 26.

Findings CK18 showed a significant decrease in group E compared to the control group only (P=0.00). CK18 values were significantly higher in the EGH group compared to the E (P=0.00) and EA (P=0.04) groups. HOMA-IR (homeostatic model assessment for insulin resistance) index had a significant decrease in the E (P=0.00) and EA (P=0.03) groups, but no significant changes were seen in the EGH group. Changes in aspartate transaminase were not significant in any of the groups. Alanine transaminase levels in all three groups of E (P=0.00), EGH (P=0.03), and EA (P=0.00) were significantly lower than those in the control group, but the inter-group changes were not significant.

Conclusion Endurance training has produced a more effective response in improving nonalcoholic fatty liver disease markers than GH and fragment peptides. Growth hormone injection can have negative consequences on some indicators of this abnormality.

Keywords:

Endurance training,
Growth hormone,
Liver, CK18

English Version

F

1. Introduction

For years, medical scientists have been looking for ways to overcome health-related abnormalities, among which in-

activity combined with a high-fat diet is one of the most important drivers of obesity and diseases, such as the fatty liver. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease. It is the main indication of liver transplantation in developed countries, and its global prevalence is estimated at 25% [1, 2]. NAFLD includes a wide range of liver damages

* Corresponding Author:

Mehrdad Fathi, PhD.

Address: Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Tel: +98 (51) 38833910

E-mail: mfathei@um.ac.ir

that progresses from simple steatosis to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis, and eventually hepatocellular carcinoma [3]. This disorder results from the deposition and accumulation of fat microvesicles in the cytoplasm of hepatocytes. This accumulation accounts for more than 5% to 10% of the liver weight and severely damages hepatocytes [4]. Insulin resistance, inactivity, and overweight increase the secretion of free fatty acids from exogenous and endogenous sources [5]. Increased re-lipogenesis and abnormalities in beta-oxidation [6] can increase fat deposition in the liver. In 90% of cases, the general symptom of fatty liver disease is elevated serum aminotransferase levels [7]. Maximus et al. recently showed that the increase in plasma Alanine Transaminase (ALT) is mainly due to insulin resistance in adipose tissue and liver triglyceride content. Therefore, improving NAFLD can effectively reduce liver enzymes [8]. Also, there is a direct relationship between Cytokeratin-18 (CK18) and liver enzymes [9]. CK18 is considered one of the most accurate serum markers in diagnosing patients with fatty liver. It is the major liver protein strand involved in hepatocyte damage and cell death, and is released into the bloodstream by caspases during apoptosis [10]. This cytokeratin is broken down by caspases 3 and 6 at two sites (ASP238 and ASP396) during apoptosis. The broken CK18 fragments are stable, resistant to proteolysis, and can be measured in plasma and serum [11].

The effects of NAFLD in patients with the disease cause a wide range of problems for the individual, including impaired growth hormone secretion [12]. In a cross-sectional study, low Growth Hormone (GH) levels were associated with a higher prevalence of NAFLD [13]. However, GH, as a single-chain polypeptide with 191 amino acids, has a two-way function in the face of reduced visceral fat: it promotes increased insulin resistance while stimulating lipolysis [14].

Insulin resistance is one of the most important primary pathophysiological mechanisms in developing this disease. This mechanism is associated with ectopic accumulation of fat in the liver, causing an increase in fatty acids in this organ [15]. Many researchers believe in the key role of insulin resistance in stimulating the accumulation of fatty acids in liver cells and consider it as the most important primary pathophysiological mechanism in the development of fatty liver disease. Insulin resistance increases fatty acid invasion in the liver in favor of lipogenesis and prevention of fats lipolysis [16]. However, growth hormone inhibits adipocyte differentiation, reduces triglycerides, and increases lipolysis through the G protein signaling pathway [17]. The 15 GH terminal amino acids stimulate lipolysis, which was first documented

by pharmacological researchers at Monash University in Australia. AOD9604 is a peptide fragment of C-terminus GH (Tyr-hGH177-19-19), a polypeptide available as AOD9604 (Fragment); it contains only 176 to 191 GH amino acids [18]. Importantly, the fragment does not stimulate insulin resistance, so its lipolytic response is higher than the growth hormone. It is stated that it has no growth and synthesis effects like growth hormone [17].

It is well known that physical activity is an excellent way to improve health, prevent, and treat obesity-related diseases. Gharghani et al. examined the effect of eight weeks of aerobic exercise on the glucose and liver enzymes response of NAFLD-induced mice. This study showed an improvement in glucose and liver enzyme responses [19]. Based on studies, exercise improves insulin resistance, increases receptor sensitivity to insulin, and generally improves glucose and fatty acid intake. All of these properties are major pathogenesis pathways of NAFLD [20]. Exercise also enhances the GH response [21]. However, despite the importance of this hormone, research on the effect of GH in the face of NAFLD is minimal and is unknown mainly due to the duality of its impact. In this study, by isolating the lipolytic fragment of growth hormone, for the first time, we could examine the effects of insulin resistance and the lipolytic fragment of this hormone both separately and in combination (GH and AOD9604). We also investigated the impact of exercise activity on nonalcoholic fatty liver-dependent factors.

2. Materials and Methods

The current study is an experimental study. The animal model consisted of adult male mice weighing 20 ± 3 g. After ten weeks of mice feeding with a high-fat diet and confirmation of fatty liver induction in them, 28 mice were randomly divided into four groups of seven each: Control group (C), Exercise (E), Exercise + Fragment (EA), exercise + growth hormone (EGH). All groups underwent a high-fat diet until the end (Table 1). During this time, the mice were kept under controlled conditions of light (12:12 h light:dark), temperature ($22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$), and humidity (about 45%). It should be noted that the mice entered the study after initial confirmation of the damage by an ultrasound specialist and examination of liver enzymes. The mice under exercise had five training sessions per week, according to Table 2. At the end of the study, 48 hours after the last training session, their weights were assessed, and the rats were anesthetized. The animal's chest was then dissected, and direct blood samples were taken from the animal's heart to ensure minimal harm to the animal.

High-fat diet

The high-fat diet consisted of the rodent-based diet, which was developed by the researcher with the addition of 12% animal fat, 2% cholesterol (German Merck), and 1% colic acid (Sigma America Co). This formula is suitable in terms of calories and energy needed to induce fatty liver (Table 1) [22, 23].

Endurance training

According to Table 2, the aerobic training program was performed for eight weeks using a special rodent machine made in Iran. First, the conveyor belt was measured with a meter, and then a cutoff point was identified as a criterion. Then, the elapsed time for a complete lap of the belt was inserted into the velocity formula and matched with the monitoring of the device. At first, a week of familiarity with the sports environment was on the agenda, and the mice worked out for 10 to 15 min every day at a speed of 10 m/min for adaptation. From the beginning of the second week, the endurance training program was carried out (Table 1). The control group was kept with only a high-fat diet without any activity [24].

Injection protocol

Injection protocol includes daily intraperitoneal injection of Cinnadaro somatropin (Sinagen made in Iran) 1 mg/kg of animal body weight and lipolytic component (AOD9604) (manufactured by Auspep Australia) 250 mc/Kg of body weight in mice [25]. It should be noted that the animal sample of the mentioned derivatives was not available for the animal model.

Blood sample collection and measurement

To avoid misinterpretation of the data, the mice were injected 48 hours after the last training session. After a night fast, the mice were anesthetized intraperitoneally with a combination of xylazine (8 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg). Then, direct blood samples were taken from the animal's heart at the rate of 1.1 ± 2 mL. After 15 min of centrifugation at 3000 rpm, their serum was separated and frozen at -80°C until further analysis.

The Amount of Aspartate Transaminase (AST) (sensitivity: IU/L2), Alanine Aminotransferase (ALT) (sensitivity: IU/L4), and glucose (sensitivity: 5 mg/dL) were measured using Pars Azmoun measuring kit and calorimetric method by autoanalyzer (Hitachi 912 made in Japan). Also, the ELISA method was used to measure the levels of insulin and CK18 (Biological Assays kit made in

China with a sensitivity of 0.031 ng/mL and 0.023 ng/mL, respectively). To evaluate insulin resistance, the evaluation model method (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance [HOMA-IR]) was used according to the following formula [26]:

$$\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin (L/mU)} \times \text{fasting glucose (L/mol)} / (1.14)$$

Statistical analysis

After collecting and entering the data into SPSS version 26, descriptive statistics were used to calculate the central tendency and dispersion indices. The Shapiro-Wilk test was used to ensure the normal distribution of data. Also, the inter-group difference means were analyzed by 1-way ANOVA and Tukey's post hoc test. The significance level was considered less than 0.05.

3. Results

Table 3 presents the weight changes of the mice after induction and intervention. Based on Table 4, the results of comparing the means and Tukey test showed that the intergroup changes of the HOMA-IR were statistically significant in the two groups of E ($P=0.00$) and EA ($P=0.03$) and lower compared with the control group, but the changes in this factor in the EGH group were not significant compared to the control group ($P=0.37$). Also, the intergroup differences of insulin resistance index between the two groups of EGH and EA was significant ($P=0.00$). Still, the difference between the two groups of E and EA ($P=0.09$) was not significant.

Our results showed that CK18 showed a significant decrease only in group E ($P=0.00$) compared to the control group and was not significant in the two groups of EA (0.17) and EGH (0.61). Also, the inter-group comparison of CK18 values in the EGH group was significantly higher than the two groups of E ($P=0.00$) and EA ($P=0.04$). Also, the difference between groups E and EA was not significant ($P=0.28$).

Changes in AST were not significant in either group compared to the control group and inter-groups ($P>0.05$). ALT values in all three groups of E ($P=0.00$), EGH ($P=0.03$), and EA ($P=0.00$) were significantly lower than the control group. However, the difference between groups E and EA ($P=0.89$) and groups E and EGH ($P=0.99$) and also groups EA and EGH ($P=0.81$) were not significant.

4. Discussion

Growth hormone deficiency in adults is associated with decreased muscle mass, increased visceral fat, abnormal fat characteristics, and insulin resistance. In addition, functional dysfunctions of the liver with hyperlipidemia and NAFLD are often seen in these individuals, usually accompanied by metabolic syndrome [12]. Some human studies have shown that GH prescription and its derivatives in adults may reduce visceral fat and improve cardiometabolic disorders [27]. However, some studies have raised concerns about increased insulin resistance and impaired fasting glucose during GH treatment, especially in obese and elderly patients [28]. Insulin resistance and obesity are two important elements in the pathogenesis of NAFLD; both increase the flow of free fatty acids from subcutaneous and visceral fat to the liver and increase the intrahepatic synthesis of fats. The current study results indicate the reduction of HOMA-IR levels in groups E and EA, consistent with Chang et al. and Lambert et al.'s studies [29]. The effect of 12 weeks of the exercise was assessed in Chang's study on male C57BL6 mice. The study mice were divided into control and high-fat diets and performed five sessions of endurance training each week. Their results showed that exercise reduced insulin sensitivity and increased pancreatic beta-cell function [30].

Increased defects in glucose metabolism and insulin resistance as one of the main preconditions for NAFLD are associated with disease progression and fibrosis. Correcting these conditions is an essential part of NAFLD treatment [31]. In general, the insulin messaging pathway can be examined in two main metabolic and non-metabolic pathways. In the non-metabolic pathway, mediators are activated that eventually enter the nucleus and cause the expression of some genes. However, the metabolic pathway activates storage pathways, such as lipogenesis and glycogenesis, and locate the glucose transporter in the membrane. Thus, glucose enters the insulin target cells and is stored in the cell [32]. Exercise increases insulin function by reducing intracellular triglyceride accumulation and increasing fatty acid oxidation [33]. Other mechanisms that may increase insulin action after aerobic exercise include increased insulin receptor signaling, increased GLUT4 glucose transporter protein, increased glycogen synthetase and hexokinase activity, decreased release, increased clearance of free fatty acids, increased release of glucose from the blood to muscle due to increased muscle capillaries and changes in muscle composition to increase glucose uptake [20].

Regarding the results obtained in the EA group, no study was found that measured the effect of the fragment on insulin resistance with and without exercise. The decrease in insulin resistance in this group can be attributed to the impact of exercise because the lipolytic effect of the fragment is estimated to be several times GH. So, the amount of free fatty acid due to lipolysis of this peptide fragment is higher, and the fragment increases β 3-AR receptor expression in rodents, which increases fat metabolism [25]. It also stimulates lipolysis in visceral adipose tissue by activating hormone-sensitive lipase, leading to the movement of free fatty acid (FFA) into the bloodstream. Increasing plasma fatty acids by various methods may affect the pathway of insulin message transmission and cause dysfunction of molecules effective in insulin message transmission [28]. So one of the ambiguities that was answered in this study was the lack of development of insulin resistance due to fragment injection, while the HOMA-IR in the EGH group was significantly higher than that in the E and EA groups. This result is consistent with the findings of Healy et al. and, in contrast with Matsumoto et al. Healy in a double-blind study, measured the effect of high-dose somatropin injections in 11 male athletes with four weekly endurance training sessions. The groups were divided into control and intervention groups, and the daily injection of somatropin in the intervention group was 0.067 mg/kg body weight. They reported that after the first and fourth weeks of fasting, insulin and HOMA-IR levels increased significantly [34]. In the Matsumoto study, patients were treated for the fatty liver with GH deficiency. It was shown that after 24 months of growth hormone injection, changes in the HOMA-IR index were not significant despite the relative increase and NAFLD-dependent liver factors decreased. In justifying these differences, it can be stated that in our and Healy's research, the study population used was engaged in exercise, and that excess injection of somatropin peptide may have produced these results. According to exercise reports, exercise alone stimulates GH [21], and injecting this hormone can have dual effects. While the study population used in the second study, had growth hormone secretion defects, and its exogenous compensation did not alter the effects of induction of this hormone on the HOMA-IR index. It should be noted that this factor did not increase in the EGH group compared to the control group, but despite exercising in this group, HOMA-IR did not show a positive change. To justify this result, we can say that GH increases glucose production through gluconeogenesis and glycogenolysis from the liver and kidneys while simultaneously suppressing the levels of glucose carriers (GLUT1) and GLUT4 in the plasma membrane

Table 1. Percentage of standard and high-fat diet ingredients

Group	%	
	Standard Diet	High-fat Diet
Fat	10	22
Carbohydrate	60	50
Protein	27	24
Other cases	3	4

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 2. Training protocol of mice during eight weeks

Week	Session	Slope	Time / speed	Warm up / Cool Down	Week	Session	Slope	Time / Speed	Warm up / Cool Down
First	1-5	0	15 minutes / 10 m/min	0	Second to eighth	6-40	5 degrees	60 minutes / 15 - 17 m/min	5 minutes / 10 m/min

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

of adipocytes. So unlike exercise, GH has diabetogenic effects [28, 35].

Decreased CK18 levels in group E are in line with the studies of Takahashi et al. (2020) and Philly et al. (2012). In the Takahashi study, 50 patients with NAFLD were divided into two groups of resistance training and control for a 12-week trial period. During the study, the exercise group performed three times a week on non-consecutive days, and their results showed that the serum levels of CK18 and FGF21 fragments decreased due to exercise in these individuals [36]. Philly's study evaluated the effect of seven days of running training on CK18 in 13 overweight people with NAFLD. They found that 60 minutes of short-term, aerobic exercise reduced CK18 maximal heart rate by 80% [36]. In justification of this result, it has been shown that hepatocyte apoptosis indices are reduced

by exercise due to its antioxidant activity and increased insulin sensitivity, so exercise provides an anti-apoptotic stimulant that leads to a decrease in CK18 fragments. In addition, this effect can be modulated by a decrease in the pathway of fatty acid synthase (FAS1). FAS, as a glycosylated protein, is expressed in the liver. It is activated by FAS ligand binding, leading to liver cell death complex (apoptosis), and FAS expression is increased in patients with fatty liver [3]. The inter-group differences of CK18 in the EGH group were higher than those of E and EA groups. A study that examined the effect of GH training and injection on CK18 was not found, but based on the relationship between apoptosis and insulin resistance, this effect can be considered one of the reasons why CK18 is higher in this group.

Table 3. Weighing of samples after induction and intervention

Group	Mean±SD	
	Before the intervention	After the intervention
Control	27±3	28±4
E	26±4	22±3
EA	25±4	21±3
EGH	25±3	23±4

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 4. Results of 1-way analysis of variance inter-group

Variable	Group	Mean±SD	F	Significance Level
Cytokeratin-18 (M30) (pg/mL)	Control	182.71±24	10.44	0.000*
	E	148.57±7		
	EA	163.28±12		
	EGH	188.27±17		
Aspartate amino transferase (AST) (IU/L)	Control	198.0±41	3.57	0.121
	E	192.7±87		
	EA	161±23		
	EGH	177±38		
Alanine aminotransferase (ALT) (IU / L)	Control	308±86	12	0.000*
	E	158±31		
	EA	138±33		
	EGH	177±59		
Homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR)	Control	92±9	14	0.000*
	E	64±9		
	EA	75±8		
	EGH	96±8		

*P<0.05.

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Regarding liver enzymes, a decrease in ALT was observed in the intervention groups compared to the control group, while changes in AST were not significant. Regarding ALT, our results agree with some studies, such as Takahashi et al. (2017) and Farzanegi et al. (2019). In the Takahashi study, the effect of both aerobic and resistance training was evaluated in 103 patients with NAFLD for 22 weeks. Their results showed that ALT enzyme and TG levels were reduced in the aerobic exercise group compared to the control group, while these changes were not significant in the resistance training group [37]. A significant decrease in ALT enzyme due to exercise can be attributed to increased liver oxidation, decreased activity and inhibition of lipogenic enzymes, increased sensitivity to tissue and liver insulin and thus reduced liver fat [38]. Exercise also protects the liver against oxidative stress and endoplasmic reticulum stress [39] and improves autophagy, [40] which are all mechanisms representing cell liver damage in NAFLD. However, ALT results were not significant between the three groups of E, EA, EGH. It seems that in all three groups, the positive effects of exercise on other independent variables are dominant.

Regarding AST, despite the relative decrease in the two groups of E and EA, the changes were not significant. Our results contradict the research of Farzanegi et al. [41] and Huber et al. [42]. In justifying this effect, we can point out the differences between the intervention in our research and other inconsistent research. On the other hand, the release of AST from organs, such as the heart and muscle, makes ALT more specific for the liver than AST. Such factors as differences in diets, the effects of exercise, and the effects of fatty liver induction with peptide injections may affect other organs releasing this enzyme, which need to be studied separately.

5. Conclusion

Exercise has a greater response to improve NAFLD markers than the two peptides of GH and fragment. The use of growth hormone may have negative consequences for some indicators of this abnormality, a response not found in its lipolytic fragment. We found that the role of insulin resistance in apoptosis may be greater than the reduction of hepatic fat oxidation pathways. Also, the frag-

ment did not have a greater positive effect on exercise, despite the greatest reduction in liver enzymes and the lack of insulin resistance. Overall, given that numerous non-clinical studies have shown no evidence of genotoxic or toxicological concerns about the safety of AOD9604 [35, 43], it may have positive biological effects in humans. However, this effect requires further research to prove.

Research limitations

Among the limitations of this research are the unavailability of animal growth hormone samples and their lipolytic fragment and the use of human derivatives for the animal model. Also, minimal research on AOD9604 was another limitation of this research.

Study suggestions

Due to the importance of the subject and the results of this study, it can be helpful to study the effects of AOD9604 and various sports exercises on factors related to the fat profile (adipokines, hormones).

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All ethical principles of the Helsinki Declaration were observed, and the research was approved by the ethics committee of the Ferdowsi University of Mashhad (Code: IR.UM.REC.1399.070).

Funding

This article was extracted from the PhD. dissertation of The last author at the Student Research Committee of the Faculty of Sports Sciences of the Ferdowsi University of Mashhad.

Authors' contributions

Study concept: Mohsen Dehbashi and Dr. Mehrdad Fathi; Writing the manuscript: Mohsen Dehbashi; The article confirmation and data analysis: Dr. Mehrdad Fathi, Professor Seyed Reza Attarzadeh Hosseini, and Dr. Mohammad Mosaferi Ziauddin.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

اثر هشت هفته تمرین استقامتی، تزریق سوماتروپین و قطعه لیپولیتیک آن بر سیتوکراتین-۱۸ و آنزیم‌های کبد موش‌های سوری القاء شده به آسیب کبدی ناشی از رژیم غذایی پر چرب

محسن دهباشی^۱، *مهرداد فتحی^۱، سید رضا عطارزاده حسینی^۱، محمد مسافری ضیاءالدینی^۱

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

اهداف: بیماری کبد چرب و غلبه بر آن، یکی از دغدغه‌های جامعه امروزی است. هدف از پژوهش موردنظر، بررسی اثر تمرین استقامتی، تزریق سوماتروپین و قطعه لیپولیتیک آن (فرگمنت) بر سطوح سیتوکراتین-۱۸ و آنزیم‌های کبد موش‌های سوری القاء شده به کبد چرب است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، ۲۸ سر موش نر به صورت تصادفی به چهار گروه هفت تایی به نام کنترل، تمرین، تمرین+فرگمنت و تمرین+هورمون رشد تقسیم شدند. برنامه تمرین استقامتی به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه با شدت ۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی در هفته اجرا شد. پروتکل تزریق سوماتروپین و فرگمنت روزانه به ترتیب یک میلی گرم و ۲۵۰ میکوگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بود. نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی داده‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس و آزمون تعقیبی توکی استفاده شده و تغییرات کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: سیتوکراتین-۱۸ در مقایسه با گروه کنترل فقط در گروه تمرین، کاهش معنادار نشان داد ($P=0/00$). مقادیر سیتوکراتین-۱۸ در گروه تمرین+هورمون رشد در مقایسه با دو گروه تمرین ($P=0/00$) و تمرین + فرگمنت ($P=0/04$) به طور معنادار بالاتر بود. شاخص Homa-IR در دو گروه تمرین ($P=0/00$) و تمرین+فرگمنت ($P=0/03$) کاهش معنادار داشت، اما در گروه تمرین+هورمون رشد تغییرات معنادار نبود. تغییرات AST در هیچ یک از گروه‌ها معنادار نبود. مقادیر ALT در هر سه گروه تمرین ($P=0/00$)، تمرین+هورمون رشد ($P=0/03$)، تمرین+فرگمنت ($P=0/00$) به طور قابل توجهی پایین‌تر از گروه کنترل بود، اما تغییرات بین گروهی معنادار نبود.

نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی در بهبود نشانگرهای NAFLD نسبت به دو پپتید سوماتروپین و فرگمنت پاسخ موثرتری ایجاد کرده است. تزریق هورمون رشد بر برخی شاخص‌های این ناهنجاری می‌تواند پیامدهای منفی داشته باشد.

تاریخ دریافت: ۱۱ آذر ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۲۹ بهمن ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

تمرین استقامتی، هورمون رشد، کبد، سیتوکراتین-۱۸

مقدمه

دامنه وسیعی از آسیب‌های کبدی است که از استئاتوز ساده به استئاتوهپاتیت، فیبروز، سیروز و درنهایت سرطان سلول‌های کبدی پیشرفت می‌کند [۳]. این اختلال به علت رسوب و تجمع ذرات درشت‌آچربی در داخل سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها^۱ به مقدار بیش از ۵ الی ۱۰ درصد وزن کبد ایجاد می‌شود و آسیب شدید هپاتوسیت‌ها را در طیف وسیعی نشان می‌دهد [۴]. مقاومت به انسولین، بی‌حرکی و اضافه وزن، افزایش تراوش اسیدهای

سالمه‌است که دانشمندان عرصه پزشکی در پی راهکار برای غلبه بر ناهنجاری‌های مرتبط با سلامت هستند. کم‌حرکی همراه با رژیم غذایی پرچرب از مهم‌ترین محرک‌های توسعه چاقی و بیماری‌هایی همچون کبد چرب است. بیماری کبد چرب غیرالکلی^۱، شایع‌ترین علت بیماری مزمن کبدی و نشانه اصلی پیوند کبد در کشورهای پیشرفته است. شیوع جهانی آن ۲۵ درصد تخمین زده شده است [۱، ۲]. NAFLD شامل

3. Macro Vesicular

4. Hepatocyte

1. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

2. NAFLD

* نویسنده مسئول:

دکتر مهرداد فتحی

نشانی: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: ۰۵۱ ۳۸۸۳۳۹۱۰ +۸۹

پست الکترونیکی: mfathei@um.ac.ir

مسیر سیگنالینگ پروتئین جی^{۱۱} لیپولیز را افزایش می دهد [۱۷]. مشخص شده است ۱۵ اسید آمینه انتهایی GH مسئول تحریک لیپولیز است که اولین بار محققان فعال در عرصه فارماکولوژی در دانشگاه موناش استرالیا موفق به فرآوری آن شدند.

AOD9604 یک قطعه پپتیدی C-terminus hGH(Tyr-hGH177-19) است. این پلی پپتید که با نام AOD9604 (فرگمنت) عرضه شد، صرفاً اسیدهای آمینه ۱۷۶ تا ۱۹۱ GH را شامل می شود [۱۸]. نکته حائز اهمیت در مورد این پپتید، ادعای عدم تحریک مقاومت به انسولین در اثر استعمال آن است که باعث شده است پاسخ لیپولیتیک آن بیشتر از هورمون رشد بوده و هیچ گونه آثار رشد و سنتز همچون هورمون رشد نداشته باشد [۱۷].

فعالیت های بدنی، روش مناسبی برای بهبود وضعیت سلامتی و جلوگیری و درمان بیماری های مرتبط با چاقی است. قرقانی و همکاران تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر پاسخ گلوکز و آنزیم های کبدی موش های القا شده به NAFLD را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها بهبود پاسخ گلوکز و آنزیم های کبدی را نشان داد [۱۹]. بر اساس مطالعات انجام شده، تمرین ورزشی باعث بهبود مقاومت به انسولین، افزایش حساسیت گیرنده ها به انسولین و به طور کلی مصرف بهتر گلوکز و اسیدهای چرب می شود که بهبود این عوامل از مسیرهای پاتوژنز اصلی ایجاد NAFLD است [۲۰]. همچنین تمرینات ورزشی باعث بهبود پاسخ GH می شود [۲۱]. این در حالی است که علی رغم اهمیت این هورمون، تحقیقات پیرامون اثر جی اچ در مواجهه با آن ای اف ال دی بسیار محدود بوده و با توجه به دوگانگی های اثرات آن تا حد زیادی ناشناخته است. در این پژوهش با جداسازی قطعه لیپولیتیک هورمون رشد، برای اولین بار می توان، اثرات مقاومت به انسولین و لیپولیتیک این هورمون را به طور مجزا مورد بررسی قرار داده و تأثیر کلی دو پپتید^{۱۲} را به همراه فعالیت ورزشی بر فاکتورهای وابسته به کبد چرب غیر الکلی مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر از نوع تحقیقات تجربی می باشد و جامعه آماری آن، موش های نر بالغ با نژاد سوری با میانگین وزن 20 ± 3 گرم تشکیل می دادند که پس از ۱۰ هفته قرار گرفتن تحت رژیم غذایی پرچرب و تأیید القاء کبد چرب، ۲۸ سر از آن ها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۴ عددی شامل گروه کنترل^{۱۳}، تمرین^{۱۴}،

چرب آزاد از منابع اگزوزن^۵ و آندوزن^۶، افزایش لیپوژنز مجدد و بی نظمی در بتا اکسیداسیون^۷، همگی می توانند رسوب گیری چربی در کبد را افزایش دهند. در ۹۰ درصد موارد نشانه عمومی در مورد بیماری کبد چرب، بالا رفتن سطوح آمینوترانسفرازهای سرم است [۷]. اخیراً ماکسیموس و همکاران نشان دادند، شیلزفا ALT پلاسما عمدتاً به دلیل مقاومت به انسولین در بافت چربی و محتوای تری گلیسیرید کبد است. بهبود NAFLD می تواند در کاهش آنزیم های کبد مؤثر باشد [۸]. همچنین مشخص شده است، رابطه مستقیم بین سیتوکراتین-۱۸^۹ و آنزیم های کبد برقرار است [۹]. CK18 که از آن به عنوان یکی از دقیق ترین نشانگرهای سرمی در تشخیص بیماران مبتلا به کبد چرب یاد می شود، اصلی ترین رشته پروتئینی متوسط کبد است که در آسیب هپاتوسیت ها، مرگ سلولی و طی آپوپتوز بر اثر کاسپازها در جریان خون آزاد می شود [۱۰]. این سیتوکراتین به وسیله کاسپازهای ۳ و ۶ در دو سایت (ای اس پی ۲۳۸ و ای اس پی ۳۹۶) طی آپوپتوز شکسته می شوند. قطعات CK18 شکسته شده پایدار، مقاوم به پروتئولیز و در پلاسما و سرم قابل اندازه گیری هستند [۱۱].

اثرات NAFLD در بیماران مبتلا، طیف وسیعی از مشکلات را برای فرد ایجاد می کند که می توان به اختلال در ترشح هورمون رشد^{۱۲} اشاره کرد [۱۲]. در یک مطالعه مقطعی، سطح GH پایین با شیوع NAFLD بالاتر همراه بود [۱۳]. با این حال جی اچ به عنوان یک پلی پپتید تک زنجیره ای با ۱۹۱ آمینو اسید در مواجهه با کاهش چربی های احشایی عملکردی دوسویه دارد، زیرا هم زمان با تحریک لیپولیز، افزایش مقاومت به انسولین را بیشتر می کند [۱۴].

مقاومت به انسولین یکی از مهم ترین اثرات پاتوفیزیولوژیکی اولیه در ایجاد این بیماری می باشد که با تجمع اکتوپیک^{۱۵} چربی در کبد مرتبط بوده، باعث افزایش اسیدهای چرب موجود در این ارگان می شود [۱۵]. در حال حاضر، بسیاری از محققین نقش مرکزی مقاومت انسولینی را به عنوان رویدادی برای تحریک تجمع اسید چرب در سلول های کبدی معرفی می کنند و آن را به عنوان مهم ترین اثر پاتوفیزیولوژیکی اولیه در ایجاد بیماری کبد چرب دانسته اند. مقاومت به انسولین، هجوم اسیدهای چرب در کبد را به نفع لیپوژنز و جلوگیری از لیپولیز چربی ها به شدت افزایش می دهد [۱۶]. در اثری متفاوت، هورمون رشد مانع از تمایز آدیپوسیت شده، تری گلیسیرید را کاهش می دهد و از طریق

5. Exogenous

6. Endogenous

7. Cytokeratin 18 (CK18)

8. ASP238 & ASP396

9. Growth Hormone (GH)

10. Ectopic

11. G

12. AOD9604&GH

13. C

14. E

شد که به صورت درون صفاقی تزریق شد [۲۵]. نمونه حیوانی مشتقات ذکر شده برای مدل حیوانی در دسترس نبود.

جمع‌آوری نمونه‌های خونی و اندازه‌گیری

به منظور اجتناب از تفسیر اشتباه داده‌ها، نمونه‌ها ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و پس از ناشتایی شبانه با ترکیبی از داروی زایلایزین^{۲۱} و کتامین^{۲۲} به صورت تزریق درون صفاقی بیهوش شدند. سپس، نمونه‌های خون مستقیم از قلب حیوان به میزان ۱/۱±۲ سی‌سی گرفته شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰، سرم آن‌ها جدا و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- فریز شد. سطوح آنزیم‌های ALT، AST و گلوکز^{۲۳} با استفاده از کیت اندازه‌گیری^{۲۴} و به وسیله روش کالریمتریک توسط دستگاه اتوآنالایزر^{۲۵} اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری مقادیر انسولین و CK18 (کیت سنجش‌های بیولوژیکی^{۲۶} به ترتیب و با حساسیت ۰/۰۳۱ ng/ml و ۰/۰۲۳ ng/ml) از روش الایزا استفاده شد. برای ارزیابی مقاومت به انسولین از روش مدل ارزیابی^{۲۷} طبق فرمول زیر استفاده شد [۲۶].

گلوکز ناشتا (میلی مول بر لیتر) ×

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{انسولین ناشتا (میکرو واحد بر لیتر)}}{(14/1)}$$

بررسی آماری

پس از جمع‌آوری و وارد کردن داده‌ها در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۲۶، برای محاسبه شاخص‌های گرایش مرکزی، پراکندگی از آمار توصیفی و برای کسب اطمینان از نرمال بودن توزیع نظری داده‌ها از آزمون آماری شاپیرو ویلک استفاده شد. همچنین تعیین تفاوت میانگین‌های بین گروهی با آزمون آماری تحلیل واریانس^{۲۸} و آزمون تعقیبی توکی بررسی شد. آزمون فرضیه‌ها کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تغییرات وزنی نمونه‌ها پس از القاء و مداخله در جدول شماره ۳ ثبت شده است. در مورد نتایج آماری پژوهش بر اساس جدول شماره ۴، نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها و آزمون توکی نشان داد، تغییرات بین گروهی شاخص HOMA از نظر آماری در مقایسه با گروه کنترل در دو گروه تمرین (P=۰/۰۰) و تمرین+فرگمنت (P=۰/۰۳) معنادار بود و کاهش داشت، اما

تمرین + فرگمنت^{۱۵}، تمرین +هورمون رشد^{۱۶} تقسیم شدند و همه گروه‌ها تا انتها تحت رژیم پر چرب قرار گرفتند (جدول ۱). در طول این مدت، موش‌ها در شرایط کنترل‌شده، نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۲۲±۳ سانتیگراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. موش‌ها پس از تأیید اولیه آسیب توسط متخصص سونوگرافی و بررسی آنزیم‌های کبد وارد پژوهش شدند. نمونه‌های تحت فعالیت ورزشی، طبق جدول شماره ۲، ۵ جلسه در هفته برنامه تمرینی داشتند. در پایان مطالعه، پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین توزین انجام شده، موش‌ها بیهوش شدند. سپس، قفسه سینه حیوان شکافته و برای اطمینان از کمترین آزار حیوان برای کشتار آن، نمونه‌های خون مستقیم از قلب حیوان گرفته شد.

رژیم غذایی پرچرب

غذای پرچرب مورد استفاده شامل غذای پایه جوندگان که با افزودن ۱۲ درصد چربی حیوانی، ۲ درصد کلسترول^{۱۷} و ۱ درصد اسید کولیک^{۱۸} توسط محقق ساخته شد. این فرمول از نظر مقدار کالری و انرژی لازم برای القای کبد چرب مناسب می‌باشد [۲۲، ۲۳] (جدول شماره ۱).

تمرین استقامتی

بر اساس جدول شماره ۲، برنامه تمرین هوازی به مدت ۸ هفته و با استفاده از دستگاه نوارگردان ویژه جوندگان ساخت کشور ایران انجام شد. ابتدا تسمه نوارگردان با متر اندازه‌گیری شد و سپس نقطه‌ای از آن به عنوان معیار مشخص شد. آنگاه مدت زمان سپری شده برای یک دور کامل تسمه نوارگردان در فرمول سرعت قرار داده شد. در نتیجه، با مانیتورینگ دستگاه مطابقت داده شد. در ابتدا، یک هفته آشنایی با محیط ورزشی در دستور کار قرار گرفت و موش‌ها هر روز ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه برای سازگاری فعالیت کردند. از ابتدای هفته دوم، برنامه تمرین استقامتی متناسب با تحقیقات صورت گرفته و جدول شماره ۱ آغاز شد. در این مدت نمونه‌های گروه کنترل بدون هیچ‌گونه فعالیتی صرفاً با رژیم پرچرب نگهداری شدند [۲۴].

پروتکل تزریق

پروتکل تزریق شامل روزانه تزریق سوماتروپین^{۱۹} یک میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن حیوان و قطعه لیپولیتیک^{۲۰} ۲۵۰ پیکوگرم به ازای هر کیلو از وزن بدن موش‌ها در نظر گرفته

15. EA

16. EGH

۱۷. شرکت مرک آلمان

۱۸. شرکت سیگما آمریکا

۱۹. کمپانی سینادارو (سینازن ساخت ایران)

۲۰. AOD9604 (ساخت شرکت Auspep کشور استرالیا)

۲۱. میلی گرم/کیلوگرم

۲۲. میلی گرم/کیلوگرم

۲۳. (درجه حساسیت mg/d5)

۲۴. شرکت پارس آزمون

۲۵. هیتاچی ۹۱۲ ساخت کشور ژاپن

۲۶. Biological Assays (ساخت کشور چین)

27. HOMA-I

28. One-Way ANOVA

جدول ۱. درصد مواد تشکیل دهنده رژیم غذایی استاندارد و پرچرب

گروه	رژیم استاندارد (درصد)	رژیم پر چرب (درصد)
چربی	۱۰	۲۲
کربوهیدرات	۶۰	۵۰
پروتئین	۲۷	۲۴
سایر موارد	۳	۴

افتخار دانش

مقاومت به انسولین است. اختلالات عملکردی کبد با چربی خون و NAFLD اغلب در افرادی قابل مشاهده است که با سندروم متابولیک همراه است [۱۲]. تعدادی از مطالعات انسانی نشان داده است، تجویز جی اچ و مشتقات آن در بزرگسالان ممکن است چربی احشایی را کاهش دهد و اختلال قلبی متابولیکی را بهبود بخشد [۲۷]. برخی از مطالعات، نگرانی در مورد افزایش مقاومت به انسولین و اختلال در گلوکز ناشتا در طول درمان GH، به ویژه در بیماران مبتلا به چاقی و بیماران مسن را ایجاد کرده است [۲۸]. مقاومت به انسولین و چاقی، دو عنصر مهم در پاتوژنز NAFLD هستند که هر دو جریان اسیدهای چرب آزاد از چربی زیر پوستی و چربی احشایی به کبد را افزایش داده و سنتز درون کبدی چربی ها را بالا می برند. یکی از نتایج تحقیق حاضر، کاهش مقادیر HOMA-IR در دو گروه تمرین و تمرین+فرگمنت بود که با تحقیقات چانگ و همکاران و لامبرت و همکاران [۲۹] همسو بود. در مطالعه چانگ که بر روی موش های نر نژاد C57BL/6 انجام شد، تأثیر ۱۲ هفته تمرین ورزشی مورد سنجش قرار گرفت. در این پژوهش، موش ها به دو گروه کنترل و رژیم غذایی پرچرب تقسیم شدند. هر هفته ۵ جلسه تمرین استقامتی انجام دادند. نتایج آن ها نشان داد، تمرین ورزشی باعث کاهش حساسیت به انسولین و افزایش عملکرد سلول های بتای پانکراس شد [۳۰].

افزایش نقص در متابولیسم گلوکز و مقاومت به انسولین به عنوان یکی از اساسی ترین پیش زمینه های ایجاد کبد چرب غیر الکلی با پیشرفت بیماری و ایجاد فیبروز در ارتباط است. اصلاح این شرایط بخشی مهم در درمان NAFLD است [۳۱]. به طور کلی، مسیر پیام رسانی انسولین در دو مسیر اصلی متابولیک و غیرمتابولیک

تغییرات این فاکتور در گروه تمرین+هورمون رشد به نسبت گروه کنترل معنادار نبود ($P=0/37$). همچنین تفاوت بین گروهی شاخص مقاومت به انسولین بین دو گروه تمرین+فرگمنت و تمرین+هورمون رشد معنادار بود ($P=0/00$)، اما تفاوت بین دو گروه تمرین و تمرین+فرگمنت ($P=0/09$) معنادار نبود.

نتایج این بررسی نشان داد، CK18 در مقایسه با گروه کنترل فقط در گروه تمرین کاهش معنادار داشت ($P=0/00$) و در دو گروه تمرین+فرگمنت ($0/17$) و تمرین+هورمون رشد ($0/61$) معنادار نبود. همچنین مقایسه بین گروهی مقادیر CK18 در گروه تمرین+هورمون رشد در مقایسه با دو گروه تمرین ($P=0/00$) و تمرین+فرگمنت ($P=0/04$) به طور معنادار بالاتر ثبت شد. تفاوت بین گروه تمرین و تمرین+فرگمنت معنادار نبود ($0/28$).

تغییرات AST در مقایسه بین گروهی و با مقایسه گروه کنترل در هیچ یک از گروه ها معنادار نبود ($P>0/05$). مقادیر ALT در هر سه گروه تمرین ($P=0/00$)، تمرین+هورمون رشد ($P=0/03$)، تمرین+فرگمنت ($P=0/00$) نسبت به گروه کنترل، کاهش معنادار داشت. هرچند تفاوت بین گروه تمرین با تمرین+فرگمنت ($0/89$) و گروه تمرین با تمرین+هورمون رشد ($0/99$) و همچنین گروه تمرین+فرگمنت با تمرین+هورمون رشد ($0/81$) در سطح معناداری نبود.

بحث

نشانه های کمبود هورمون رشد در بزرگسالان، کاهش توده عضلانی، افزایش چربی احشایی، مشخصات غیرطبیعی چربی و

جدول ۲. پروتکل تمرین موش های سوری طی ۸ هفته

هفته	جلسه	شیب	زمان / سرعت	گرم / سرد کردن	هفته	جلسه	شیب	زمان / سرعت	گرم / سرد کردن
اول	۱				دوم الی هشتم	۲			
	۳	صفر	۱۵ دقیقه / ۱۰ متر بر دقیقه	صفر		۳			
	۴					۴			
	۵					۵			

افتخار دانش

جدول ۳. توزین نمونه‌ها پس از ازاله و مداخله

گروه	قبل از مداخله	بعد از مداخله
کنترل	۳±۲۷	۴±۲۸
E	۲۶±۴	۲۲±۳
EA	۲۵±۴	۲۱±۳
EGH	۲۵±۳	۲۳±۴

افتخ دانش

اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود [۳۳]. مکانیزم‌های دیگری نیز می‌توانند سبب افزایش عمل انسولین بعد از انجام تمرینات هوازی شوند که عبارت‌اند از افزایش پیام‌رسانی پیش‌گیرنده‌های انسولین، افزایش پروتئین انتقال‌دهنده گلوکز Glut4، افزایش فعالیت گلیکوزن سنتتاز و هگزوکیناز، کاهش رهایی و افزایش پاک شدن اسیدهای چرب آزاد، افزایش رهایی گلوکز از خون به عضله به علت افزایش مویرگ‌های عضله و تغییرات در ترکیب عضله برای افزایش برداشت گلوکز [۲۰].

قابل بررسی است. در مسیر غیر متابولیک، واسطه‌هایی فعال شده که در نهایت وارد هسته می‌شوند و باعث رونویسی بعضی از ژن‌ها می‌شوند. از یک طرف، مسیر متابولیک باعث فعال شدن مسیر ذخیره‌های مثل لیپوژن و گلیکوزن شده و از طرف دیگر، باعث قرارگیری ناقل غشایی گلوکز در غشا می‌شود. بدین ترتیب، باعث ورود گلوکز به سلول‌های هدف انسولین و ذخیره شدن در سلول می‌شود [۳۲]. فعالیت ورزشی موجب افزایش عملکرد انسولین از طریق کاهش تجمع تری‌گلیسرید درون سلولی و افزایش

جدول ۴. نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین گروهی

متغیر	گروه	میانگین/انحراف استاندارد	مقادیر F	سطح معناداری
سیتوکراتین-۱۸ (pg/ml)(M30)	کنترل	۱۸۲/۷۱±۲۴	۱۰/۴۴	۰/۰۰۰*
	E	۱۴۸/۵۷±۷		
	EA	۱۶۳/۲۸±۱۲		
	EGH	۱۸۸/۲۷±۱۷		
آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) (Iu/L)	کنترل	۱۹۷/۰±۴۱	۳/۵۷	۰/۱۲۱
	E	۱۹۲/۷±۸۷		
	EA	۱۶۱±۲۳		
	EGH	۱۷۷±۳۸		
آلاتین آمینو ترانسفراز (ALT) (Iu/L)	کنترل	۳۰۸±۸۶	۱۲	۰/۰۰۰*
	E	۱۵۸±۳۱		
	EA	۱۳۸±۳۳		
	EGH	۱۷۷/۴±۵۹		
HOMA-IR	کنترل	۹۲±۹	۱۴	۰/۰۰۰*
	E	۶۴±۹		
	EA	۷۵±۸		
	EGH	۹۶±۸		

* سطح معناداری، $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است.

افتخ دانش

کبد و کلیه افزایش می‌دهد. این در حالی است که هم‌زمان میزان حامل گلوکز Glut1 و Glut4 را در غشاء پلاسمای سلول‌های چربی سرکوب می‌کند. از این رو، برخلاف تمرینات ورزشی، جی‌اچ دارای اثرات دیابت‌زنی می‌باشد [۲۸، ۳۵].

کاهش مقادیر CK18 در گروه تمرین، همسو با تحقیقات تاکاهاشی و همکاران و فیلی و همکاران از دیگر نتایج این تحقیق بود. در تحقیق تاکاهاشی ۵۰ بیمار مبتلا به NAFLD برای یک دوره آزمایشی ۱۲ هفته‌ای در قالب ۲ گروه تمرین مقاومتی و کنترل تقسیم شدند. در طول مطالعه، گروه تمرین هفته‌ای ۳ بار در روزهای غیرمتوالی مبادرت به انجام فعالیت کردند. نتایج آن‌ها نشان داد، سطح سرمی قطعات CK18 و FGF21 در اثر تمرین ورزشی در این افراد کاهش یافت [۳۶]. در تحقیق فیلی، اثر ۷ روز تمرین دویدن بر CK18 در ۱۳ فرد دارای اضافه وزن مبتلا به NAFLD مورد ارزیابی قرار گرفت. آن‌ها بیان کردند که ۶۰ دقیقه تمرین هوازی کوتاه مدت در محدوده ۸۰ درصد حداکثر ضربان قلب بیشینه CK18 را کاهش می‌دهد [۳۶]. این نتیجه نشان داده است که شاخص‌های آپوپتوز هپاتوسیت در اثر تمرینات ورزشی از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی آن و افزایش حساسیت به انسولین کاهش می‌یابد. بنابراین تمرین ورزشی یک محرک ضد آپوپتوزی را ایجاد می‌کند که منجر به کاهش قطعات CK18 می‌شود. این امر می‌تواند توسط کاهش در مسیر پیام‌دهی FAS1 تعدیل شده باشد، FAS به عنوان یک پروتئین گلیکوزیله که در کبد سنتز می‌شود، توسط اتصال لیگاند اف ای اس فعال شده و منجر به مرگ سلول‌های کبدی (آپوپتوز) می‌شود و میزان FAS در بیماران مبتلا به کبد چرب افزایش می‌یابد [۳۷]. تغییرات بین گروهی CK18 در گروه تمرین هورمون رشد از دو گروه تمرین و تمرین+فرگمنت بالاتر بود. تحقیقی که اثر تمرین و تزریق GH بر CK18 را بررسی کرده باشد، یافت نشد. می‌توان با استناد به رابطه آپوپتوزیس و مقاومت به انسولین، این اثر را یکی از دلایل بالاتر بودن CK18 در این گروه دانست.

در مورد آنزیم‌های کبدی، کاهش ALT در گروه‌های مداخله نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، در حالی که تغییرات ای اس تی معنادار نبود. نتایج ما با برخی تحقیقات از جمله تاکاهاشی و همکاران و فرزانی و همکاران در مورد ALT همسو بود. در مطالعه تاکاهاشی تأثیر دو تمرین هوازی و مقاومتی در ۱۰۳ بیمار دارای NAFLD به مدت ۲۲ هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد، آنزیم ALT و سطوح تری گلیسرید در گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل کاهش دارد، در حالی که این تغییرات در گروه تمرین مقاومتی معنادار نبود [۳۷]. کاهش معنادار آنزیم ALT در اثر تمرین ورزشی را می‌توان به افزایش اکسیداسیون کبدی، کاهش فعالیت و مهار آنزیم‌های لیپوژنیک، افزایش حساسیت به انسولین بافتی و کبدی و در نتیجه کاهش چربی کبد نسبت داد [۳۸]. همچنین فعالیت ورزشی از کبد در مقابل استرس اکسیداتیو و استرس رتیکولوم

در مورد نتایج کسب شده در گروه تمرین فرگمنت، هیچ تحقیقی که تأثیر فرگمنت بر مقاومت به انسولین را با و بدون تمرین ورزشی سنجیده باشد، یافت نشد. کاهش مقاومت به انسولین در این گروه را می‌توان به اثرات تمرین نسبت داد، زیرا در شرایطی که اثر لیپولیتیک فرگمنت چند برابر GH تخمین زده شده، میزان اسید چرب آزاد ناشی از لیپولیز این قطعه پپتیدی بیشتر است. فرگمنت رونویسی ۲۹-Beta-3 adrenergic receptors را در جوندگان افزایش می‌دهد که سبب افزایش متابولیسم چربی می‌شود [۲۵]. همچنین لیپولیز را از طریق فعال سازی لیپاز حساس به هورمون در بافت چربی احشایی تحریک می‌کند که منجر به حرکت اسید چرب آزاد^{۳۰} به گردش خون می‌شود. افزایش اسیدهای چرب پلازما با روش‌های مختلف ممکن است بر مسیر انتقال پیام انسولین تأثیر داشته باشد و سبب اختلال در عملکرد مولکول‌های موثر در انتقال پیام انسولین شود [۲۸]. از این رو، یکی از ابهاماتی که در این پژوهش به آن پاسخ داده شد، عدم گسترش مقاومت به انسولین ناشی از تزریق فرگمنت بود، در حالی که شاخص هما-آی آر در گروه تمرین+هورمون رشد به طور معناداری از دو گروه تمرین و فرگمنت بالاتر بود. این نتیجه با یافته‌های هلی و همکاران همسو و با ماتسوموتو و همکاران در تضاد بود. هلی در یک تحقیق دوسوکور تأثیر تزریق دُزهای بالای سوماتروپین را در ۱۱ ورزشکار مرد زنده استقامتی با ۴ جلسه تمرین استقامتی هفتگی مورد سنجش قرار داد. گروه‌ها در دو دسته کنترل و مداخله تقسیم شدند. تزریق روزانه سوماتروپین در گروه مداخله ۰/۰۶۷ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن انجام شد. مطابق گزارش آن‌ها، پس از هفته اول و چهارم سطوح انسولین ناشتایی و هما-آی آر افزایش معنادار داشت [۳۴]. مطالعه ماتسوموتو بر وضعیت بیماران در حال درمان کبد چرب با نقص ترشح جی‌اچ نشان می‌دهد، پس از ۲۴ ماه تزریق هورمون رشد، تغییرات شاخص هما-آی آر علی‌رغم افزایش نسبی معنادار نبود و فاکتورهای کبدی وابسته به NAFLD کاهش یافت. در توجیه این تفاوت‌ها می‌توان گفت، در تحقیق ما و هلی، جامعه مورد استفاده در حال انجام فعالیت ورزشی بوده و احتمالاً تزریق مزاد پپتید سوماتروپین باعث ایجاد این نتایج شده است، زیرا طبق گزارشات، تمرین ورزشی خود به تنهایی محرک GH می‌باشد [۲۱] و تزریق این هورمون می‌تواند آثار مضاعف ایجاد کند، در حالی که جامعه مورد استفاده در تحقیق دوم دارای نقص ترشح در هورمون رشد بود و جبران اگزوزن آن تأثیرات القاء این هورمون بر شاخص HOMA-IR را تغییر نداده است. این فاکتور در گروه تمرین+هورمون رشد نسبت به گروه کنترل افزایش نیافت، اما علی‌رغم انجام تمرین ورزشی در این گروه، HOMA-IR تغییر مثبت از خود نشان نداد. در توجیه این نتیجه می‌توان گفت، هورمون رشد تولید گلوکز را از طریق گلوکونئوژنز و گلیکونولیز از

29. Beta-3 adrenergic receptors

30. FFA

بررسی اثرات AOD9604 به همراه تمرین‌های مختلف ورزشی بر فاکتورهای مرتبط با پروفایل چربی (آدیپوکاین‌ها، هورمون‌ها) می‌تواند مفید واقع شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کلیه اصول اخلاقی بیانیه هلسینکی رعایت شده و پژوهش در دانشگاه فردوسی مشهد با شناسه اخلاق IR.UM. REC.1399.070 مصوب شده است.

حامی مالی

این مقاله محصول پایان دوره دکتری تخصصی نویسنده درباره موش‌های سوری القاء شده به کبد چرب بوده و مصوب کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده علوم ورزشی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد و بدون دریافت کمک مالی انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

ایده اصلی: محسن دهباشی، دکتر مهرداد فتحی، نگارش مقاله: محسن دهباشی، تأیید نهایی مقاله و آنالیز داده‌ها: دکتر مهرداد فتحی، پروفیسور سید رضا عطارزاده حسینی، دکتر محمد مسافری ضیاءالدین.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌کنیم.

آندوپلاسمی^{۳۱} محافظت می‌کند [۳۹] و اتوفازی را بهبود می‌بخشد [۴۰] که همگی مکانیسم‌های نماینده آسیب کبدی سلول در NAFLD هستند. با این حال، نتایج ALT بین سه گروه تمرین، تمرین+فرگمنت، تمرین+هورمون رشد معنادار نبود که به نظر می‌رسد در هر ۳ گروه اثرات مثبت تمرین بر سایر متغیرهای مستقل غالب است.

علی‌رغم کاهش نسبی در دو گروه تمرین و تمرین+فرگمنت، تغییرات معنادار نبود، نتایج ما در مورد ای اس تی با تحقیقات فرزانی و همکاران [۴۱] و هوپر و همکاران [۴۲] در مغایرت بود. در توجیه این نتیجه می‌توان به تفاوت‌های مداخله در تحقیقات ما با سایر تحقیقات ناهمخوان اشاره کرد. از طرفی، انتشار ای اس تی از اندام‌هایی چون قلب و عضله باعث می‌شود ای ال تی اختصاصی‌تر از ای اس تی برای کبد در نظر گرفته شود. بنابراین عواملی چون تفاوت در رژیم غذایی نمونه‌ها، تأثیر تمرینات ورزشی و همچنین اثرات القاء کبد چرب به همراه تزریق پپتیدها ممکن است بر سایر اندام‌های آزادکننده این آنزیم مؤثر باشد که نیاز به بررسی مجزا دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق بیانگر این است که تمرین ورزشی، پاسخ بزرگتری در بهبود نشانگرهای ان ای اف ال دی نسبت به دو پپتید جی اچ و فرگمنت ایجاد کرده است. چه بسا، استعمال هورمون رشد بتواند پیامدهای منفی بر برخی شاخص‌های این ناهنجاری داشته باشد، پاسخی که در قطعه لیپولیتیک آن مشاهده نشد. احتمالاً نقش مقاومت به انسولین در آپوپتوز بیش از احیای مسیرهای اکسیداسیون چربی کبدی است و فرگمنت علی‌رغم بیشترین کاهش در آنزیم‌های کبدی و عدم ایجاد مقاومت به انسولین، تأثیر مثبت بیشتری از تمرین ایجاد نکرد. با توجه به اینکه مطالعات غیر کلینیکی متعدد، هیچ گونه شواهدی از نگرانی‌های ژنوتوکسیک یا سم‌شناسی در مورد ایمنی AOD9604 نشان نداده‌اند [۳۵، ۴۳]، ممکن است AOD9604 اثرات بیولوژیکی مثبتی در انسان داشته باشد که برای اثبات قطعی به تحقیقات بیشتری نیاز است.

محدودیت‌های پژوهش

در دسترس نبودن نمونه حیوانی هورمون رشد و قطعه لیپولیتیک آن و استفاده از مشتقات انسانی برای مدل حیوانی از محدودیت‌های این تحقیق است و تحقیقات بسیار محدود پیرامون AOD9604 از دیگر محدودیت‌های این پژوهش است.

پیشنهاد برای آیندگان

با توجه به اهمیت موضوع و نتایج حاصل از این تحقیق،

References

- [1] Iqbal U, Perumpail BJ, Akhtar D, Kim D, Ahmed A. The epidemiology, risk profiling and diagnostic challenges of nonalcoholic fatty liver disease. *Medicines*. 2019; 6(1):41. [DOI:10.3390/medicines6010041] [PMID] [PMCID]
- [2] Hunter GR, Brock DW, Byrne NM, Chandler-Laney PC, Del Corral P, Gower BA. Exercise training prevents regain of visceral fat for 1 year following weight loss. *Obesity*. 2010; 18(4):690-5. [DOI:10.1038/oby.2009.316] [PMID] [PMCID]
- [3] Rajabi S, Askari R, Haghighi A, Razaviyazadeh N. [Effect of resistance-interval training with two different intensities on cytokeratin18 and some functional parameters in women with fatty liver (Persian)]. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*. 2020; 23(3):68-81. [DOI:10.22038/ijogi.2020.15999] https://ijogi.mums.ac.ir/article_15999.html?lang=en
- [4] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346(16):1221-31. [DOI:10.1056/NEJMr011775] [PMID]
- [5] Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001; 50(8):1844-50. [DOI:10.2337/diabetes.50.8.1844] [PMID]
- [6] Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006; 290(5):G852-8. [DOI:10.1152/ajpgi.00521.2005] [PMID]
- [7] Goessling W, Friedman LS. Increased liver chemistry in an asymptomatic patient. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005; 3(9):852-8. [DOI:10.1016/s1542-3565(05)00416-7] [PMID]
- [8] Bril F, Sninsky JJ, Baca AM, Superko HR, Portillo Sanchez P, Biernacki D, et al. Hepatic steatosis and Insulin resistance, but not steatohepatitis, promote atherogenic dyslipidemia in NAFLD. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016; 101(2):644-52. [DOI:10.1210/jc.2015-3111] [PMID]
- [9] Teimouri N, Nayeri H. Serum cytokeratin-18 fragment levels, paraoxonase activity and lipid profile of non-alcoholic fatty liver in iran. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2016; 15(3):183-91. <http://ijld.tums.ac.ir/article-1-5382-en.html>
- [10] Festi D, Schiumerini R, Marzi L, Di Biase AR, Mandolesi D, Montrone L, et al. Review article: The diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease - availability and accuracy of non-invasive methods. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2013; 37(4):392-400. [DOI:10.1111/apt.12186] [PMID]
- [11] Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology*. 2009; 50(4):1072-8. [DOI:10.1002/hep.23050] [PMID] [PMCID]
- [12] Takahashi Y, Iida K, Takahashi K, Yoshioka H, Fukuoka H, Takeno R, et al. Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency. *Gastroenterology*. 2007; 132(3):938-43. [DOI:10.1053/j.gastro.2006.12.024] [PMID]
- [13] Rufinatscha K, Röss C, Folie S, Haas S, Salzmann K, Moser P, et al. Metabolic effects of reduced growth hormone action in fatty liver disease. *Hepatology International*. 2018; 12(5):474-81. [DOI:10.1007/s12072-018-9893-7] [PMID] [PMCID]
- [14] Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet*. 1963; 1(7285):785-9. [DOI:10.1016/s0140-6736(63)91500-9] [PMID]
- [15] Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: Potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012; 1821(5):809-18. [DOI:10.1016/j.bba-lip.2011.10.016] [PMID]
- [16] Moosavi-Sohroforouzi A, Ganbarzadeh M. [Reviewing the physiological effects of aerobic and resistance training on insulin resistance and some biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease (Persian)]. *Kaums Journal*. 2016; 20(3):282-96. <http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-3091-en.html>
- [17] Ng FM, Sun J, Sharma L, Libinaka R, Jiang WJ, Gianello R. Metabolic studies of a synthetic lipolytic domain (AOD9604) of human growth hormone. *Hormone Research in Paediatrics*. 2000; 53(6):274-8. [DOI:10.1159/000053183] [PMID]
- [18] Stier H, Vos E, Kenley D. Safety and tolerability of the hexadecapeptide AOD9604 in humans. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013; 3(1-2):7-15. [DOI:10.4021/jem157w] <https://www.jofem.org/index.php/jofem/article/view/157>
- [19] Ghareghani P, Shanaki M, Ahmadi S, Khoshdel AR, Rezvan N, Meshkani R, et al. [Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice (Persian)]. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2018; 12(Suppl 2):80-9. [DOI:10.1016/j.orcp.2017.01.004] [PMID]
- [20] Grace A, Chan E, Giallauria F, Graham PL, Smart NA. Clinical outcomes and glycaemic responses to different aerobic exercise training intensities in type II diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cardiovascular Diabetology*. 2017; 16(1):37. [DOI:10.1186/s12933-017-0518-6] [PMID] [PMCID]
- [21] Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013; 28(Suppl 4):59-63. [DOI:10.1111/jgh.12407] [PMID]
- [22] Tu LN, Showalter MR, Cajka T, Fan S, Pillai VV, Fiehn O, et al. Metabolomic characteristics of cholesterol-induced non-obese nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):6120. [DOI:10.1038/s41598-017-05040-6] [PMID] [PMCID]
- [23] Efati M, Khorrami M, Zarei Mahmmodabadi A, Raouf Sarshoori J. [Induction of an animal model of non-alcoholic fatty liver disease using a formulated high-fat diet (Persian)]. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2016; 18(11):57-62. <http://jbums.org/article-1-6134-en.html> [DOI:10.22088/jbums.18.11.57]
- [24] Mohebbi H, Rohani H, Hassan-nia S, Pirooznia N. [The effect of obesity and endurance training-induced weight loss on UCP3 mRNA expression in C57BL/6 MICE (Persian)]. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013; 15(3):311-21. <http://ijem.sbm.ac.ir/article-1-1502-en.html>
- [25] Heffernan M, Summers RJ, Thorburn A, Ogru E, Gianello R, Jiang WJ, et al. The effects of human GH and its lipolytic fragment (AOD9604) on lipid metabolism following chronic treatment in obese mice and beta(3)-AR knock-out mice. *Endocrinology*. 2001; 142(12):5182-9. [DOI:10.1210/endo.142.12.8522] [PMID]
- [26] Van Dijk TH, Laskewitz AJ, Grefhorst A, Boer TS, Bloks VW, Kuipers F, et al. A novel approach to monitor glucose metabolism using stable isotopically labelled glucose in longitudinal studies in mice. *Laboratory Animals*. 2013; 47(2):79-88. [DOI:10.1177/0023677212473714] [PMID]
- [27] Cao JM, Ong H, Chen C. Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2006; 17(1):13-8. [DOI:10.1016/j.tem.2005.11.004]

- [28] Kim SH, Park MJ. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 2017; 22(3):145-52. [DOI:10.6065/apem.2017.22.3.145] [PMID] [PMCID]
- [29] Lambert K, Hokayem M, Thomas C, Fabre O, Cassan C, Bourret A, et al. Combination of nutritional polyphenols supplementation with exercise training counteracts insulin resistance and improves endurance in high-fat diet-induced obese rats. *Scientific Reports*. 2018; 8(1):2885. [DOI:10.1038/s41598-018-21287-z] [PMID] [PMCID]
- [30] Chang GR, Hou PH, Chen WK, Lin CT, Tsai HP, Mao FC. Exercise affects blood glucose levels and tissue chromium distribution in high-fat diet-fed C57BL6 mice. *Molecules*. 2020; 25(7):1658. [DOI:10.3390/molecules25071658] [PMID] [PMCID]
- [31] Amanat S, Eftekhari M, Bagheri Lankarani K, Fararouei M. [Effect of genistein supplementation on insulin sensitivity, insulin resistance, and beta cells function index in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, controlled trial (Persian)]. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2018; 13(1):1-10. <http://nsft.sbm.ac.ir/article-1-2402-en.html>
- [32] Fujimoto WY. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*. 2000; 108(Suppl 6A):9S-14S. [DOI:10.1016/S0002-9343(00)00337-5] [PMID]
- [33] Baharloo S, Taghiyan F, Hedayati M. [Effect of aerobic exercise on glucose, insulin and insulin resistance in subclinical hypothyroidism overweight-obese women (Persian)]. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2014; 21(125):75-84. <http://rjms.iuums.ac.ir/article-1-3416-en.html>
- [34] Healy ML, Gibney J, Russell-Jones DL, Pentecost C, Croos P, Sönksen PH, et al. High dose growth hormone exerts an anabolic effect at rest and during exercise in endurance-trained athletes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003; 88(11):5221-6. [DOI:10.1210/jc.2002-021872] [PMID]
- [35] Cox HD, Smeal SJ, Hughes CM, Cox JE, Eichner D. Detection and in vitro metabolism of AOD9604. *Drug Testing and Analysis*. 2015; 7(1):31-8. [DOI:10.1002/dta.1715] [PMID]
- [36] Fealy CE, Haus JM, Solomon TP, Pagadala M, Flask CA, McCullough AJ, et al. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Applied Physiology* (1985). 2012; 113(1):1-6. [DOI:10.1152/jappphysiol.00127.2012] [PMID] [PMCID]
- [37] Takahashi A, Imaizumi H, Hayashi M, Okai K, Abe K, Usami K, et al. Simple resistance exercise for 24 weeks decreases alanine aminotransferase levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sports Medicine International Open*. 2017; 1(1):E2-E7. [DOI:10.1055/s-0042-117875] [PMID] [PMCID]
- [38] Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: A practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterology*. 2014; 5(3):211-18. [DOI:10.1136/flgastro-2013-100403] [PMID] [PMCID]
- [39] da Luz G, Frederico MJ, da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, de Pinho RA, et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *European Journal of Applied Physiology*. 2011; 111(9):2015-23. [DOI:10.1007/s00421-010-1802-2] [PMID]
- [40] Rosa-Caldwell ME, Lee DE, Brown JL, Brown LA, Perry RA JR, Greene ES, et al. Moderate physical activity promotes basal hepatic autophagy in diet-induced obese mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2017; 42(2):148-56. [DOI:10.1139/apnm-2016-0280] [PMID]
- [41] Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, Asadi M, Azarbayjani MA. [Mechanisms of beneficial effects of exercise training on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation (Persian)]. *European Journal of Sport Science*. 2019; 19(7):994-1003. [DOI:10.1080/17461391.2019.1571114] [PMID]
- [42] Huber Y, Pfirrmann D, Gebhardt I, Labenz C, Gehrke N, Straub BK, et al. Improvement of non-invasive markers of NAFLD from an individualised, web-based exercise program. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2019; 50(8):930-39. [DOI:10.1111/apt.15427] [PMID]
- [43] Moré MI, Kenley D. Safety and metabolism of AOD9604, a novel nutraceutical ingredient for improved metabolic health. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2014; 4(3):64-77. [DOI:10.14740/jem213w] <https://www.jofem.org/index.php/jofem/article/view/213>