

Changes in miR-122 Gene Expression in Liver Tissue and Serum Levels of ALT and AST Following Resistance Training and Boldenone Injection in Male Rats

Safiyeh Ghanbari-Abarghooi¹,

Amir Rashidlamir²,

Nahid Bijeh³,

Madjid Momeni-Moghaddam⁴

¹ PhD Student in Sport Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³ Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

(Received November 13, 2021 ; Accepted February 22, 2022)

Abstract

Background and purpose: MicroRNA-122 (miR-122) is the most abundant liver-specific miRNA. It has been reported that miR-122 plays several biological roles such as iron homeostasis, tumor suppressor, hepatic fatty acid regulation, and in hepatocyte differentiation. The Purpose of this study was to investigate changes in liver miR-122 gene expression and serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) enzymes after resistance training and boldenone undecylenate (boldenone) steroid injection in male rats.

Materials and methods: Twenty male Wistar rats were randomly divided into four groups: control (n=5), resistance training (n=5), resistance training+ boldenone injection (n=5), and boldenone injection (n=5). Resistance training was performed three sessions a week for eight weeks. Boldenone was injected twice per week (2mg/kg). Seventy-two hours after last training, blood and tissue samples were collected. Serum levels of ALT and AST were measured via photometric method and miR-122 gene expression in the liver was assessed by real-time PCR. Statistical analysis was conducted using SPSS V16.

Results: Reduced expression of liver miR-122 was found in boldenone group, while the expression of miR-122 was higher in resistance training group, however, the difference was not significant ($P= 0.514$). Also, no significant difference was found in serum AST and ALT levels between the experimental groups ($P= 1.00$ and $P= 0.527$, respectively).

Conclusion: In this study, liver miR-122 responded differently to resistance training and boldenone injection. However, clear understanding of its mechanism requires further studies.

Keywords: MicroRNA-122, resistance training, boldenone, liver

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (207): 13-25 (Persian).

* **Corresponding Author:** Amir Rashidlamir - Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
(E-mail: rashidlamir@um.ac.ir)

بررسی تغییرات بیان ژن *miR-122* در بافت کبد و سطوح سرمی آنزیم های ALT و AST پس از تمرین مقاومتی و تزریق بولدنون در موش های صحرایی نر

صفیه قنبری ابرقوئی¹

امیر رشیدلمیر²

ناهید بیژنه³

مجید مومنی مقدم⁴

چکیده

سابقه و هدف: MicroRNA-122 (*miR-122*) فراوان ترین miRNA اختصاصی بافت کبد است. گزارش شده است که *miR-122* نقش های متعددی از جمله تعادل آهن، مهار تومور، تنظیم اسید چرب کبدی و تمایز سلول های کبدی ایفا می کند. این مطالعه با هدف، بررسی تغییرات بیان ژن *miR-122* کبد و سطوح سرمی آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) پس از تمرین مقاومتی و تزریق استروئید بولدنون آندسیلنات (بولدون) در موش های صحرایی نر، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، 20 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به چهار گروه کنترل (5 سر)، تمرین مقاومتی (5 سر)، تمرین مقاومتی + تزریق بولدنون (5 سر) و تزریق بولدنون (5 سر) تقسیم شدند. تمرین مقاومتی به مدت هشت هفته و هفته ای سه جلسه انجام شد. تزریق بولدنون دو بار در هفته (دو میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش) انجام شد. 72 ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، نمونه گیری خونی و بافتی انجام گردید. اندازه گیری سطوح سرمی آنزیم های ALT و AST با روش فتومتریک و بیان ژن *miR-122* کبد با استفاده از روش Real-Time PCR انجام شد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه 16) انجام گرفت.

یافته ها: کاهشی در بیان ژن *miR-122* در گروه تزریق بولدنون یافت شد، در حالی که بیان این ژن در گروه تمرین مقاومتی بالاتر بود، با این وجود تفاوت، معنی دار نبود ($P=0/514$). تفاوت معنی داری در سطوح سرمی آنزیم های ALT و ALT بین گروه ها یافت نشد (به ترتیب؛ $P=1/00$ و $P=0/527$).

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که *miR-122* کبد، به تزریق استروئید بولدنون و تمرین مقاومتی پاسخ های مختلفی می دهد. با این حال، شناخت سازوکار آن نیازمند مطالعات بیش تری است.

واژه های کلیدی: MicroRNA-122، تمرین مقاومتی، بولدنون، کبد

مقدمه

کبد به عنوان یک اندام حیاتی متابولیکی، علاوه بر ذخیره سازی و تولید مواد مغذی، در سم زدایی و متابولیسم ترکیبات دارویی و برخی مکمل های غذایی و صنعتی از جمله استروئیدهای آنابولیک - آندروژنیک نقش مهمی

E-mail: rashidlamir@um.ac.ir

مؤلف مسئول: امیر رشیدلمیر - مشهد: میدان آزادی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد - دانشکده علوم ورزشی

1. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

2. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

3. استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

4. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

☞ تاریخ دریافت: 1400/8/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/10/3 تاریخ تصویب: 1400/12/3

ایفا می‌کند (1،2). استروئیدهای آنابولیک - آندروژنیک دسته‌ای از مکمل‌های ورزشی هستند که به صورت خوراکی یا تزریقی توسط برخی ورزشکاران و به ویژه در رشته‌های قدرتی جهت افزایش قدرت و توده عضلانی و همچنین توسط غیر ورزشکاران جهت زیبایی اندام، مصرف می‌شوند (3-5). علی‌رغم وجود شواهد بسیار مبنی بر ایجاد مشکلات پزشکی ناشی از مصرف استروئیدهای آنابولیک از جمله ایجاد بیماری‌های کبدی شامل کلساز، آدنوم خوش‌خیم کبدی، زردی، سرطان کبد و همچنین بروز مشکلاتی مانند آتروفی بیضه، ایجاد آکنه، ژینکوماستی و تغییرات خلق و خوی (پرخاشگری)، سوء استفاده از این داروها در بین ورزشکاران، همچنان رایج است (6). یکی از استروئیدهای آنابولیک - آندروژنیک پرمصرف، بولدنون آندوسیلنات (Boldenone Undecylenate) است که براساس گزارشات علمی، مصرف آن، آسیب اندام‌های مختلف بدن از جمله آسیب‌های کبدی را به همراه داشته است (7-10). در راستای درک صحیح و مناسب از میزان آسیب‌رسانی این مکمل‌های استروئیدی در بافت کبد و عملکردهای آن، بسیاری از پژوهشگران فراتر از بررسی شاخص‌های رایج تشخیص آسیب کبدی یعنی سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST در پلاسما یا سرم، در پی دستیابی به نقش بیومارکرهای مهم و مبتنی بر مبانی ژنتیکی از جمله MicroRNAs جهت تشخیص بهتر و دقیق‌تر این آسیب‌ها هستند (11). MirRNAs زیر گروه بزرگی از RNA های غیر کد کننده‌ی 21 تا 23 نوکلئوتیدی هستند که با اتصال به ناحیه ترجمه نشدنی انتهای mRNAs هدف منجر به سرکوب رونویسی و یا تخریب mRNA شده و در نتیجه باعث غیر فعال سازی ژن هدف می‌شوند (12). یکی از فراوان ترین miRNAs شناسایی شده در کبد انسان و حیواناتی مانند موش‌های سوری، موش‌های صحرایی و سگ آبی، miR-122 است که علاوه بر نقش آن در تنظیم مسیرهای متابولیکی، به عنوان بیومارکر مهم و اصلی در تشخیص آسیب‌های کبدی نیز معرفی شده

است (13،14). براساس گزارشات علمی، بیان سرمی و بافتی این بیومارکر تشخیصی می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله چاقی و نوع رژیم غذایی، سطوح پلاسمایی برخی هورمون‌ها و همچنین فعالیت ورزشی قرار گیرد (11،24-15).

به طور کلی فعالیت ورزشی از عوامل مؤثر در تنظیم بیولوژی miRNAs است و در کنترل پیشرفت بیماری‌های کبد نیز نقش مهمی ایفا می‌کند (25،26). براساس بررسی‌های انجام شده، مطالعات اندکی به بررسی تأثیرات تمرینات ورزشی بر بیان ژن miR-122 کبد پرداخته‌اند که اغلب این تحقیقات نیز، تمرینات ورزشی اینتروال با شدت بالا را مورد بررسی قرار دادند (20،21،27). از طرفی مطالعات انجام شده در زمینه اثر همزمان ورزش و مصرف استروئیدها و به ویژه بولدنون، اغلب به بررسی تغییرات پارامترهای خونی مرتبط با آسیب‌های کبدی، و ضایعات هیستوپاتولوژیک بافت کبد اکتفا کرده‌اند (10،28،29). نظر به اهمیت miR-122 به عنوان بیومارکر جدید آسیب کبدی و نیز با توجه به شیوع آسیب‌های کبدی ناشی از افزایش مصرف مکمل‌های استروئیدی در بین ورزشکاران و به ویژه ورزشکاران رشته‌های قدرتی، مطالعه حاضر با هدف بررسی تغییرات سطوح بیان ژن miR-122 بافت کبد و سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی ALT و AST، متعاقب هشت هفته تمرین مقاومتی همراه با تزریق بولدنون، انجام پذیرفت (14،30).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، 20 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (ده تا دوازده هفته ای و میانگین وزن $51/8 \pm 332/6$ گرم) از مرکز پرورش حیوانات دانشکده علوم پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، خریداری و به طور تصادفی به چهار گروه کنترل (5 سر)، تمرین مقاومتی (5 سر)، تمرین مقاومتی + داروی بولدنون (5 سر) و داروی بولدنون (5 سر) تقسیم شدند. موش‌ها تحت شرایط کنترل شده نور (12 ساعت روشنایی و 12

ساعت تاریکی، دما 22 ± 1 درجه سانتی گراد) و رطوبت 50 درصدی در قفسه‌های مخصوص جوندگان نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. پروتکل مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد با کد اخلاق IR.MUMS.REC.1396.61 مورد تأیید قرار گرفت.

پروتکل تمرین مقاومتی

قبل از اجرای پروتکل تمرینی، آزمودنی‌ها به مدت یک هفته (پنج جلسه) با نحوه انجام فعالیت آشنا شدند. بدین نحو که در دو جلسه اول حیوان بدون حمل وزنه و در سه جلسه بعدی با وزنه‌هایی معادل 10 تا 20 درصد از وزن بدن حیوان که به دم حیوان متصل شده بود، به مدت 5 دقیقه بر روی تردمیل با شیب 10 تا 15 درجه و سرعت 5 متر در دقیقه فعالیت کرد. پس از این مرحله، برنامه تمرین مقاومتی به مدت هشت هفته و هفته‌ای سه جلسه انجام شد. در هفته اول، میزان وزنه‌های بسته شده به دم موش‌ها 50 درصد از وزن بدن آن‌ها بود که با افزایش 10 درصدی در هر هفته ادامه یافت. بدین صورت که وزنه‌ای از طریق یک گیره به دم آن‌ها متصل گردید. در این حالت، حیوان بر روی تردمیل با شیب 20 درجه و سرعت 10 متر بر دقیقه راه می‌رفت. تعداد ست‌ها در هر جلسه تمرین 10 تا 12 و تعداد تکرارها در هر ست بین 8 تا 14 بار در نظر گرفته شد. از زمان شروع حرکت حیوان تا زمان توقف آن یک تکرار محسوب می‌شد که به‌طور معمول این زمان 6 تا 8 ثانیه و میزان جابه‌جایی حیوان 20 تا 40 سانتی متر بود. فاصله استراحت بین ست‌ها براساس افزایش اضافه‌بار، 60 تا 160 ثانیه در نظر گرفته شد. در این مدت گروه کنترل هیچ گونه تمرینی انجام ندادند (جدول شماره 1). این شیوه تمرینی برگرفته از مطالعات علمی پیشین بوده است (31، 8). تزریق داروی بولدنون آندوسیلنات به گروه‌های دریافت‌کننده دارو، به‌صورت دو بار در هفته و با دوز دو میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش به صورت تزریق عمیق عضلانی در عضلات پشت

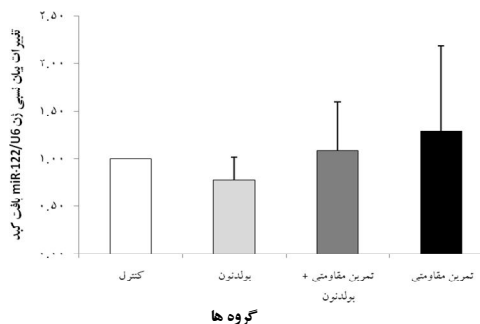
ران انجام شد (10). لازم به ذکر است که بولدنون با 0/1 میلی لیتر روغن زیتون رقیق گردید و جهت یکسان‌سازی شرایط مطالعه، گروه‌های کنترل و تمرین مقاومتی نیز 0/1 میلی لیتر روغن زیتون را به عنوان دارونما دریافت کردند (9).

جدول شماره 1: پروتکل تمرین مقاومتی

هفته	تعداد جلسه در هفته	تعداد ست در هر جلسه	مدت زمان هر ست (دقیقه)	استراحت بین ست‌ها (دقیقه)
1	3	10	2	1
2	3	10	2	1
3	3	11	2	1/5
4	3	11	2/5	1/5
5	3	11	2	2
6	3	12	1/5	2
7	3	12	1/5	2/5
8	3	12	1	2/5

موش‌ها 72 ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، با ترکیبی از کتامین (30 تا 50 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (سه تا پنج میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند (32). نمونه‌گیری خونی به‌طور مستقیم از بطن چپ حیوان انجام و به لوله آزمایش منتقل گردید. پس از نگهداری نمونه‌های خونی به مدت تقریباً 15 دقیقه در دمای آزمایشگاه، جهت جداسازی سرم سانتریفیوژ (3000 دور در دقیقه) شد. بافت کبد نیز سریعاً جدا و بلافاصله پس از شستشو با سرم فیزیولوژی سرد شده، با نیتروژن مایع منجمد و تا زمان اندازه‌گیری بیان ژن، به فریزر با دمای 80- درجه سانتی گراد منتقل گردید. جهت اندازه‌گیری بیان ژن miR-122 بافت کبد به روش Real-Time PCR، ابتدا 15 میلی گرم از بافت کبد براساس پروتکل کیت استخراج RNA (miRCURY™ RNA Isolation Kit- Tissue, Cat. No. 40030011, Exiqon, United states) لیز گردید و پس از استخراج و تخلیص RNA، کیفیت آن توسط دستگاه نانو دراپ (Thermo Scientific, USA) اندازه‌گیری شد. سنتز cDNA نیز براساس دستورالعمل و برنامه زمانی-گرمایی PCR مشخص شده در کیت سنتز (400203301, Exiqon, United states)، و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Astec PC818)، ساخت کشور

کنترل گردید، در حالی که در پایان برنامه تمرین مقاومتی، افزایش 28/9 درصدی این ژن در کبد مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که در گروه بولدنون با تمرین مقاومتی علاوه بر بازگرداندن بیان این ژن به سطح کنترل، با افزایش 8/8 درصدی نیز همراه بود، با این وجود تغییرات مقادیر بیان ژن *miR-122* بافت کبد در بین گروه‌ها معنی‌دار نبود ($\chi^2=0/795$ و $P=0/514$) (نمودار شماره 1).



نمودار شماره 1: تغییرات بیان نسبی ژن *miR-122* بافت کبد در بین گروه‌ها

نتایج آزمون کروسکال والیس تفاوت معنی‌داری را در سطوح سرمی آنزیم‌های ALT در بین گروه‌های تحقیق نشان نداد ($P=0/527$). اما از لحاظ درصد تغییرات، افزایش 31/57 و 3/94 درصدی سطوح ALT به ترتیب در گروه‌های تزریق بولدنون و تمرین مقاومتی و همچنین کاهش 5/5 درصدی در گروه تمرین مقاومتی با تزریق بولدنون نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. همچنین نتایج حاکی از عدم تغییرات معنی‌دار در سطوح سرمی آنزیم AST در بین گروه‌های تحقیق پس از هشت هفته تمرین مقاومتی و تزریق بولدنون بود ($P=1/00$) (جدول شماره 2). در واقع پس از مداخله تمرین و تزریق بولدنون تغییرات بسیار اندکی در بین گروه‌های تحقیق مشاهده شد، به‌طوری‌که کاهش 5/41 و 0/7 درصدی سطوح سرمی آنزیم AST به ترتیب در گروه‌های تزریق بولدنون و تمرین مقاومتی با تزریق بولدنون و نیز افزایش 6/11 درصدی در گروه تمرین مقاومتی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

ژاپن) انجام شد. در نهایت برنامه ریل - تایم PCR جهت بررسی سطوح بیان ژن *miR-122* با استفاده از پرایمر ژن *miR-122* (UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG)، همچنین پرایمر ژن U6 به عنوان ژن هاسکیپینگ (شرکت سکن طب، تهران، ایران) و طبق دستورالعمل کیت واکنش (ExiLENT SYBR Green master) (mix, Cat. No. 400203401, Exiqon, United states) در طی دو مرحله در دستگاه cDNA (Rotor-Gene 3000 Universal cDNA Synthesis) (Kit, Cat. No. Hold به مدت 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی گراد، مرحله Cycling به مدت 10 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی گراد و سپس 60 ثانیه در دمای 60 درجه سانتی گراد (40 سیکل)، انجام شد. اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های ALT و AST نیز به روش فتومتریک و با استفاده از کیت پارس آزمون (تهران، ایران) و دستگاه اتوآنالایزر Selectra XL ساخت کمپانی Vital Scientific کشور هلند انجام شد. حساسیت کیت آنزیم ALT برابر با 4 IU/L (International Unit/Litr) و حساسیت کیت آنزیم AST برابر با 2 IU/L بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 انجام شد. با توجه به عدم توزیع طبیعی داده‌های مربوط به سطوح سرمی آنزیم‌های ALT، AST براساس آزمون شاپیروویلک، جهت بررسی تفاوت‌های بین گروهی از آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس استفاده شد. همچنین پس از بررسی میزان بیان ژن *miR-122* با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، عدم توزیع نرمال داده‌های حاصل با آزمون شاپیروویلک تأیید و از این‌رو جهت مقایسه تفاوت میانگین گروه‌ها، از آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس استفاده گردید (33). اختلاف معناداری آماری در سطح $P<0/05$ تعیین شد.

یافته‌ها

تحلیل داده‌های مربوط به بیان ژن *miR-122* در بافت کبد، نشان داد که تزریق بولدنون موجب کاهش 22/4 درصدی در بیان ژن *miR-122* در مقایسه با گروه

جدول شماره 2: بررسی تغییرات سطوح سرمی آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز پس از هشت هفته تمرین مقاومتی و تزریق بولدنون در بین گروه ها

متغیر	گروه	کنترل (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	بولدنون (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	تمرین مقاومتی + بولدنون (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	تمرین مقاومتی (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Chi-square	سطح معنی داری
آلانین آمینوترانسفراز (U/L)	15/20 $\pm$ 1/78	20/00 $\pm$ 3/53	14/4 $\pm$ 3/97	15/8 $\pm$ 2/68	0/319	0/672	
آسپارات آمینوترانسفراز (U/L)	85/0 $\pm$ 25/91	80/40 $\pm$ 19/25	84/4 $\pm$ 41/07	90/20 $\pm$ 61/49	0/001	1/00	

بحث

کبد، اندام هدف ترکیبات دارویی مختلف از جمله استروئیدهای آنابولیک - آندروژنیک است که این داروها علاوه بر تحت تأثیر قرار دادن متابولیسم کبد، باعث ایجاد آسیب های مختلف کبدی می شوند (11). علی رغم وجود اطلاعات قابل ملاحظه ای درباره تأثیر مصرف استروئیدهای آنابولیک از جمله بولدنون بر بافت های مختلف بدن و به ویژه بافت کبد و با بررسی های انجام شده در منابع مختلف علمی، مطالعه حاضر نخستین مطالعه ای است که تأثیر مصرف بولدنون و نیز اثر همزمان تمرین مقاومتی و مصرف بولدنون را بر بیان ژن miR-122 بافت کبد، ارزیابی نموده است (10، 28، 29، 34، 35).

تقریباً 70 درصد miRNAs کبد را miR-122 تشکیل می دهد که به عنوان یک عامل کلیدی در رشد، تمایز، هموستاز و عملکردهای متابولیکی کبد دخالت دارد (36). در برخی مطالعات تغییرات بیان miR-122 متعاقب انواع رژیم غذایی و انجام فعالیت های ورزشی گزارش شده است (24-20). فعالیت ورزشی به عنوان درمان غیر دارویی در بسیاری از بیماری ها توصیه شده است و یکی از اثرات فیزیولوژیک آن در بسیاری از موارد، تغییر در بیان ژن های مختلف از جمله miRNAs است (37). miRNAs نقش تنظیمی مهمی در مسیرهای سیگنالینگ دخیل در سازگاری و پاسخ به ورزش و تمرینات ورزشی دارند، اما این که انواع تمرینات ورزشی چگونه miRNAs را در بافت های مختلف تحت تأثیر قرار می دهند، هنوز مشخص نیست (38). در رابطه با تأثیر مطلق ورزش بر بیان ژن miR-122، Castano و همکاران (2020)، در مطالعه ای کاهش سطوح miR-122 در بافت کبد و عضله اسکلتی را متعاقب پنج هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا (22 متر در دقیقه)، گزارش کردند (20).

Sansoni و همکاران (2018)، نیز کاهش سطوح پلاسمایی miR-122 را به دنبال تمرینات مکرر دوی سرعت کوتاه مدت با شدت بسیار زیاد مشاهده کردند (23). همچنین Hakansson و همکاران (2018) در مطالعه ای اظهار داشتند که سطوح پلاسمایی miR-122 متعاقب تمرینات استقامتی شدید در دوچرخه سواران حرفه ای نسبت به افراد مبتلا به بیماری عروق محیطی تغییرات کاهشی داشته است (22). همچنین Cui و همکاران (2015) در مطالعه ای خود بیان کردند که سطوح پلاسمایی Mir-122 پس از ورزش حاد با شدت بالا کاهش یافت (21). Kalaki-Jouybari و همکاران (2020) نیز با بررسی تأثیر تمرینات ورزشی (اینتروال با شدت بالا) بر بیان ژن miR-122 در موش های دیابتی، اثر مطلوب فعالیت ورزشی بر بافت کبد را از طریق افزایش بیان ژن miR-122 عنوان کرده و گزارش کردند که بین بیان miR-122 در بافت کبد و بیان ژن های لیپوژنیک ارتباط منفی وجود دارد (27). اما گزارشات ضد و نقیضی هم وجود دارد که نشان می دهد مهار miR-122 به طور مستقیم منجر به تنظیم کاهشی آنزیم های لیپوژنیک مانند اسید چرب سنتتاز (Fatty acid synthetase) و استیل کوآ-کربوکسیلاز (Acetyl-CoA carboxylase)، افزایش بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب و کاهش تجمع تری گلیسریدهای درون سلولی و همچنین کاهش ساخت کلسترول می شود، از این رو به نظر می رسد سازو کار تنظیمی miR-122 بر ژن های هدف آن، مکانیسم های مبهم پیچیده ای دارد که شناسایی آن نیازمند مطالعات بیش تر و دقیق تر است (39، 40).

در مطالعه حاضر هر چند، بیان miR-122 متعاقب تزریق استروئید بولدنون روند کاهشی داشت و تمرین مقاومتی با افزایش بیان این ژن، مانع کاهش بیشتر بیان

miR-122 در گروه تمرین مقاومتی و مصرف بولدنون شد، اما این تغییرات معنی دار نبود و لذا با نتایج مطالعات پیشین همسو نیست که از دلایل احتمالی آن می توان به تفاوت در نوع پروتکل فعالیت ورزشی، تفاوت در نوع آزمودنی ها و نمونه مورد بررسی (بافت یا سرم) اشاره کرد، چرا که در مطالعات پیشین آزمودنی های انسانی و یا حیوانی (خرگوش و رت) را متعاقب تمرینات ورزشی هوازی و بی هوازی با شدت بالا مورد بررسی قرار داده اند (20-23، 27). اکثر بررسی ها میزان بیان ژن را در نمونه سرمی اندازه گیری کردند که با توجه به اظهارات برخی محققان مبنی بر ارتباط منفی سطوح بیان ژن *miR-122* در بافت کبد (در هر دو حالت سالم و آسیب دیده) با مقادیر سرمی این ژن، تفاوت در نمونه گیری ممکن است نتایج متفاوتی را نشان دهد (41).

تغییرات سطوح بیان ژن *miR-122* در برخی بیماری های کبدی گزارش شده است (42، 43). Trebicka و همکاران (2013) در مطالعه ای اظهار داشتند که سطوح بیان ژن *miR-122* در کبد آسیب دیده در مقایسه با کبد سالم روند کاهشی دارد (41). از جمله دلایل بررسی *miR-122* به عنوان یک بیومارکر مولکولی مهم در آسیب های کبدی ناشی از مصرف استروئیدهای آنابولیک، تغییرات سطوح *miR-122* به طور مستقیم به عنوان یک عارضه جانبی ناشی از مصرف این داروها است (44). در مطالعه حاضر عدم تغییر معنی دار بیان *miR-122* متعاقب مصرف استروئید بولدنون ممکن است به علت دوز مصرفی پایین و همچنین نوع ساختار داروی بولدنون اندسینات باشد، چرا که ساختار شیمیایی داروی بولدنون از نوع 17-بتا هیدروکسی (17-beta hydroxyl) است و به دلیل افزودن استرهای روغنی به این دسته از استروئیدهای آنابولیک-آندروژنیک، این نوع داروها به طور آهسته از طریق سیستم لنفاوی وارد جریان خون شده و متابولیزم کبدی آن ها به حداقل می رسد و لذا اظهار شده است که در دوزهای پایین (دو میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) نسبت به دوزهای بالاتر (پنج میلی گرم به ازای

هر کیلو گرم وزن بدن) باعث آسیب کمتر در بافت کبد می شوند (10، 45). علی رغم اثرات فیزیولوژیک مصرف کوتاه مدت استروئیدهای آنابولیک در نمونه های انسانی و حیوانی مانند افزایش قدرت و استقامت از طریق افزایش توده عضلانی اسکلتی، ساخت پروتئین و بهبود در اندازه عضلات، مطالعات نشان می دهد که سوء استفاده از این داروها باعث آسیب به بافت های مختلف بدن از جمله، مخچه، طحال، کبد و بیضه می شود (10، 46-48). در این میان بافت کبد به عنوان اندام هدف و محل متابولیسم داروهای استروئیدی، در معرض آسیب جدی قرار دارد (49). داروهای استروئیدی با ایجاد استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش تولید گونه های اکسیژن واکنش پذیر در سلول های کبد همراه است که متعاقباً منجر به پاسخ های التهابی و فیبروزیک می گردد (50). در نتیجه باعث آسیب بافت کبد و رهایش *miR-122* از سلول های کبد می شود که با کاهش سطوح بافتی بیان این ژن همراه است (34، 51). از طرفی با توجه به آسیب بافت بیضه و کاهش سطوح تستوسترون پلاسمایی متعاقب مصرف برخی استروئیدهای آنابولیک و از جمله بولدنون، هر چند در مطالعه حاضر سطوح پلاسمایی تستوسترون و لپتین اندازه گیری نشد، اما با توجه به نتایج مطالعات پیشین مبنی بر رابطه معکوس سطوح پلاسمایی تستوسترون و هورمون لپتین - سائتوکاین مترشحه از بافت چربی -، ممکن است بولدنون از طریق کاهش سطوح پلاسمایی تستوسترون، موجب افزایش سطح پلاسمایی هورمون لپتین شده و از این طریق با کاهش بیان ژن *miR-122* کبدی در فرایند فیروز کبدی دخالت کند (17، 52-56). از اهداف دیگر مطالعه حاضر متعاقب هشت هفته تمرین مقاومتی و مصرف داروی بولدنون، بررسی سطوح سرمی آنزیم های AST و ALT بود که نتایج نشان داد انجام هشت هفته تمرین مقاومتی و مصرف داروی بولدنون باعث ایجاد تغییرات ناچیزی در سطوح پلاسمایی این آنزیم ها گردید. در مطالعات مختلف گزارش شده است، اختلال در سطوح سرمی آنزیم های کبدی که یکی از نشانگرهای آسیب

کبدی است ناشی از مصرف داروهای استروئیدی است (57، 58). هر چند مکانسیم‌های مولکولی دقیق اثرات استروئیدهای آنابولیک آندروژنیک بر آنزیم‌های کبدی به خوبی شناسایی نشده است، اما به نظر می‌رسد افزایش سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST ممکن است ناشی از رهايش این آنزیم‌ها از سلول‌های آسیب دیده کبدی به درون گردش خون باشد (59). در این زمینه، Barakat و همکاران (2015)، در یک مدل حیوانی (رت) آسیب بافت کبد را متعاقب مصرف 12 هفته تزریق درون عضلانی بولدنون آندوسیلنات (پنج میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) گزارش کردند که از جمله نتایج آن‌ها افزایش معنی‌دار آنزیم‌های ALT و AST در بافت کبد بود (28). در پژوهش دیگری، Al-Desoki و همکاران (2019)، با تزریق درون عضلانی بولدنون آندوسیلنات (پنج میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) در طول 15 روز (یک بار در ابتدا و یک بار در انتهای دوره)، افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی را در آزمودنی‌های حیوانی (خرگوش) گزارش کردند (29). از علل ناهمخوانی نتایج مطالعه حاضر با تحقیقات مذکور می‌توان به تفاوت در نوع آزمودنی‌ها، طول دوره مصرف دارو، دفعات تزریق و دوز مصرفی داروی بولدنون اشاره کرد، چنان‌که در برخی از مطالعات پیشین آسیب‌های شدیدتر کبدی در دوزهای بالاتر بولدنون گزارش شده است (10). همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد تأثیر فعالیت‌های بدنی بر آنزیم‌های کبدی یکسان نیست. هر چند اغلب مطالعات نقش تمرینات هوازی را بر بهبود عملکرد کبد تأیید کرده‌اند، اما در رابطه با اثر تمرینات مقاومتی اختلاف نظرهای زیادی وجود دارد (60، 61). برخی مطالعات عدم تأثیر معنی‌دار تمرینات مقاومتی را بر بهبود عملکرد کبد نشان داده‌اند در حالی که مطالعاتی وجود دارد که نقش مثبت تمرینات مقاومتی را بر بهبود آنزیم‌های کبدی گزارش کرده‌اند (62-66). به عنوان نمونه، اراضی و همکاران (2017)، به بررسی تأثیر 8 هفته تمرین مقاومتی بر سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی در آزمودنی‌های حیوانی

موش پرداختند که نتایج آن‌ها عدم تغییر سطوح آنزیم‌های ALT و AST متعاقب هشت هفته تمرین مقاومتی بود که با نتایج مطالعه حاضر در این بخش همسو است (67). اما یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج مطالعه پرستش و نادى (2020)، که کاهش معنادار سطوح سرمی آنزیم‌های ALT و AST را در موش‌های دیابتی و سالم، متعاقب 10 هفته تمرین مقاومتی (با استفاده از نردبان) گزارش کردند، مغایر بوده است (68). از علل احتمالی عدم همخوانی این نتایج می‌توان تفاوت در طول دوره تمرینی و نیز مدل تمرین مقاومتی (تمرین مقاومتی با استفاده از نردبان در مطالعه آن‌ها، و تمرین مقاومتی بر روی تردمیل در مطالعه حاضر) را نام برد، چرا که، نوع، مدت و شدت فعالیت ورزشی می‌تواند بر میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی تأثیرگذار باشد (69).

در مجموع براساس مطالعه حاضر اگرچه تمرین مقاومتی و مصرف بولدنون تغییرات معنی‌داری بر بیان ژن *miR-122* نداشت، با این وجود هر یک از مداخله تمرینی و مصرف داروی استروئیدی بولدنون، اثرات متضادی را بر بیان ژن *miR-122* بافت کبد نشان داد. یکی از محدودیت‌ها و نقاط ضعف مطالعه حاضر، عدم بررسی تغییرات ساختاری بافت کبد متعاقب مصرف داروی بولدنون و تمرین مقاومتی بود که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده جهت درک بهتر اثرات استروئید بولدنون به‌طور هم زمان بر تغییرات ساختاری بافت کبد و ارتباط آن با تغییرات بیان ژن *miR-122* در کبد، مورد توجه قرار گیرد. همچنین عدم بررسی بیان ژن‌های هدف *miR-122* و نیز سطوح سرمی *miR-122* از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر بود که با توجه به قابلیت اندازه‌گیری بیان این ژن در سرم به عنوان بیومارکر مهم تشخیص آسیب کبدی، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده تغییرات سطوح سرمی این ژن و ژن‌های هدف آن نیز متعاقب انواع تمرینات ورزشی و مصرف استروئیدهای آنابولیک بررسی شود (14). زیرا قابلیت اندازه‌گیری بیان *miR-122* در سرم، می‌تواند زمینه‌ی مطالعات کاربردی

سپاسگزاری

این مطالعه برگرفته از رساله دکتری مورد تأیید در دانشکده علوم ورزشی دانشگاه فردوسی مشهد به شماره 43086 می‌باشد و بدین وسیله از حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌گردد.

بیش‌تری را جهت شناسایی سازوکارهای دقیق‌تر تغییرات این بیومارکر و تشخیص سریع‌تر ارتباط احتمالی آن با میزان آسیب‌های کبدی، به‌ویژه در آزمودنی‌هایی که در معرض استفاده از داروهای استروئیدی قرار گرفته‌اند، امکان‌پذیر سازد.

References

1. Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem Cell Biol* 2009; 131(6): 713-726.
2. Solimini R, Rotolo M, Mastrobattista L, Mortali C, Minutillo A, Pichini S, et al. Hepatotoxicity associated with illicit use of anabolic androgenic steroids in doping. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(1 Suppl): 7-16.
3. Abbasnezhad A, Mahdavi M, Kianmehr M, Ghorbani M, Motaghy MR, Sohrabi M, et al. The effects of anabolic-androgenic steroids on DNA damage in bodybuilders' blood lymphocytes. *Biomarkers* 2021; 26(8): 685-690.
4. Bertozzi G, Sessa F, Albano GD, Sani G, Maglietta F, Roshan MH, et al. The role of anabolic androgenic steroids in disruption of the physiological function in discrete areas of the central nervous system. *Mol Neurobiol* 2018; 55(7): 5548-5556.
5. Rahman SAHA, Zabbon AA, Abdulhadi FS. Effect of Anabolic-Androgenic and Nutritional supplements on the Reproductive hormone, the Hematological parameters and baldness of athletes in Baghdad city. *J Pharm Sci Res* 2018; 10(7): 1643-1645.
6. Yonis SD, Al-Shouk A-HM, Abd A, Hachem AS. Histological Effect of Androgenic Anabolic Steroids on Liver. *Indian J Forensic Med Toxicol* 2021; 15(1): 1480-1487.
7. Behairy A, Mohamed WA, Ebraheim LL, Soliman MM, Abd-Elhakim YM, El-Sharkawy NI, et al. Boldenone Undecylenate-Mediated Hepatorenal Impairment by Oxidative Damage and Dysregulation of Heat Shock Protein 90 and Androgen Receptors Expressions: Vitamin C Preventive Role. *Front Pharmacol* 2021; 12: 651497.
8. Matinhomae H, Ziaolhagh S, Azarbayjani M, Piri M. Effects of Boldenone consumption and resistance exercise on hepatocyte morphologic damages in male wistar rats. *Eur J Exp Biol* 2014; 4(2): 211-214.
9. Tousson E, Alm-Eldeen A, El-Moghazy M. p53 and Bcl-2 expression in response to boldenone induced liver cells injury. *Toxicol Ind Health* 2011; 27(8): 711-718.
10. Ziaolhagh SJ, Khojasteh L, Ziaolhagh SS, Yahyaei B. The effect of boldenone anabolic steroid, and endurance and resistance training on liver damage markers in rats. *Feyz* 2018; 22(2): 143-152 (Persian).
11. Salamin O, Jaggi L, Baume N, Robinson N, Saugy M, Leuenberger N. Circulating microRNA-122 as potential biomarker for detection of testosterone abuse. *PLoS One* 2016; 11(5): e0155248.

12. Young DD, Connelly CM, Grohmann C, Deiters A. Small molecule modifiers of microRNA miR-122 function for the treatment of hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma. *J Am Chem Soc* 2010; 132(23): 7976-7981.
13. Wu S, Guo W, Liang S, Lu H, Sun W, Ren X, et al. Systematic analysis of the regulatory roles of microRNAs in postnatal maturation and metergasis of liver of breeder cocks. *Sci Rep* 2018; 8(1): 1-14.
14. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic micro RNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2014; 34(7): e302-e307.
15. Lischka J, Schanzer A, Hojreh A, Ba-Ssalamah A, de Gier C, Valent I, et al. Circulating microRNAs 34a, 122, and 192 are linked to obesity-associated inflammation and metabolic disease in pediatric patients. *Int J Obes (Lond)* 2021; 45(8): 1763-1772.
16. Osés M, Margareto Sanchez J, Portillo MP, Aguilera CM, Labayen I. Circulating miRNAs as biomarkers of obesity and obesity-associated comorbidities in children and adolescents: a systematic review. *Nutrients* 2019; 11(12): 2890.
17. Cao Q, Zhu X, Zhai X, Ji L, Cheng F, Zhu Y, et al. Leptin suppresses microRNA-122 promoter activity by phosphorylation of foxO1 in hepatic stellate cell contributing to leptin promotion of mouse liver fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018;339:143-150.
18. Delić D, Grosser C, Dkhil M, Al-Quraishy S, Wunderlich F. Testosterone-induced upregulation of miRNAs in the female mouse liver. *Steroids* 2010; 75(12): 998-1004.
19. Zhai X, Cheng F, Ji L, Zhu X, Cao Q, Zhang Y, et al. Leptin reduces microRNA-122 level in hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Mol Immunol* 2017; 92: 68-75.
20. Castaño C, Mirasierra M, Vallejo M, Novials A, Párrizas M. Delivery of muscle-derived exosomal miRNAs induced by HIIT improves insulin sensitivity through down-regulation of hepatic FoxO1 in mice. *PNAS* 2020; 117(48): 30335-30343.
21. Cui SF, Li W, Niu J, Zhang CY, Chen X, Ma JZ. Acute responses of circulating microRNAs to low-volume sprint interval cycling. *Front Physiol* 2015; 6: 311.
22. Håkansson KE, Sollie O, Simons KH, Quax PH, Jensen J, Nossent AY. Circulating small non-coding RNAs as biomarkers for recovery after exhaustive or repetitive exercise. *Front Physiol* 2018; 9: 1136.
23. Sansoni V, Perego S, Vernillo G, Barbuti A, Merati G, La Torre A, et al. Effects of repeated sprints training on fracture risk-associated miRNA. *Oncotarget* 2018; 9(26): 18029-18040.
24. Zhao Y, Zhang A, Wang Y, Hu S, Zhang R, Qian S. Genome-wide identification of brain miRNAs in response to high-intensity intermittent swimming training in *Rattus norvegicus* by deep sequencing. *BMC Mol Biol* 2019; 20(1): 1-15.
25. Xiao J, Bei Y, Liu J, Dimitrova-Shumkovska J, Kuang D, Zhou Q, et al. miR-212 downregulation contributes to the protective effect of exercise against non-alcoholic fatty liver via targeting FGF-21. *J Cell Mol Med* 2016; 20(2): 204-216.
26. Hasani A, Ansari R, Mazani A. Effect of 8 weeks of aerobic training and using chicory extractive supplementation on serum levels of ALT and AST enzymes in women with fatty liver. *IJOGI* 2016; 19(10): 1-8 (Persian).
27. Kalaki-Jouybari F, Shanaki M, Delfan M, Gorgani-Firouzjae S, Khakdan S. High-

- intensity interval training (HIIT) alleviated NAFLD feature via miR-122 induction in liver of high-fat high-fructose diet induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem* 2020; 126(3): 242-249.
28. Barakat L, Tousson E, Ibrahim W, El-Hakeem A. Role of propolis in improving hepatic and renal damage in boldenone undecylenate in male rats. *American Journal of Biological Chemistry* 2015; 3(1): 8-15.
 29. Desouky A, Abdelwahab S, Elshwaf M. Effect of Thyme, Ginger and Boldenone as Growth Promoters on some biochemical blood parameters in white Male New-Zealand Rabbits. *BVMJ* 2019; 37(2): 6-13.
 30. Rashidlamir A, Dehbashi S, Taghizadeh S. Study the prevalence of legal and illegal supplements between athlete's men in Bodybuilders and powerlifting field. *Shomal J Manage Physiol Sport* 2014; 2: 1-11 (Persian).
 31. Aparicio VA, Nebot E, Porres JM, Ortega FB, Heredia JM, López-Jurado M, et al. Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. *Br J Nutr* 2011; 105(6): 836-845.
 32. Ghanbari Niaki A, Ghanbari Abarghoi S, Gholizadeh M. Heart ATP-Binding Cassette Protein A1 and G1, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and Liver X Receptors Genes Expression in Response to Intensive Treadmill Running and Red Crataegus pentaegyna (Sorkh valik) in Male Rats. *Zahedan J Res Med Sci* 2015; 17(5): 964.
 33. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
 34. Mayada R, Taghred M, Haytham A. Boldenone-induced apoptotic, structural, and functional alterations in the liver of rabbits. *World Rabbit Sci* 2015; 23(1): 39-46.
 35. Tousson E, El-Moghazy M, Massoud A, El-Atrash A, Sweef O, Akel A. Physiological and biochemical changes after boldenone injection in adult rabbits. *Toxicol Ind Health* 2016; 32(1): 177-182.
 36. Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122—a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol* 2015; 62(2): 448-457.
 37. Masi LN, Serdan TDA, Levada-Pires AC, Hatanaka E, dos Reis Silveira L, Cury-Boaventura MF, et al. Regulation of gene expression by exercise-related micromas. *Cell Physiol Biochem* 2016; 39(6): 2381-2397.
 38. Domańska-Senderowska D, Laguette M-JN, Jegier A, Ciężczyk P, September AV, Brzezińska-Lasota E. MicroRNA profile and adaptive response to exercise training: a review. *Int J Sports Med* 2019; 40(04): 227-235.
 39. Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, de Sousa MC, Foti M. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut* 2019; 68(11): 2065-2079.
 40. Wen J, Friedman JR. miR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor suppression. *J Clin Invest* 2012; 122(8): 2773-2776.
 41. Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, Strack I, Roggendorf M, Viazov S, et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol* 2013; 58(2): 234-239.
 42. Mandala A, Janssen RC, Palle S, Short KR, Friedman JE. Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Nutritional Origins and Potential Molecular Mechanisms. *Nutrients* 2020; 12(10): 3166.

43. Sulaiman SA, Muhsin NI, Jamal R. Regulatory non-coding RNAs network in non-alcoholic fatty liver disease. *Front Physiol* 2019; 10: 279.
44. Sessa F, Salerno M, Di Mizio G, Bertozzi G, Messina G, Tomaiuolo B, et al. Anabolic androgenic steroids: Searching new molecular biomarkers. *Front Pharmacol* 2018; 9: 1321.
45. Attarzadeh Hosseini SR, Rashid Lamir A, Dehbashi M. Comparison of the Effects of 17-alpha-alkyl Steroids and 17-beta-hydroxy Esters on the Levels of Liver Enzymes and Hematological Factors in Male Bodybuilders. *Horizon Med Sci* 2016; 22(1): 21-26 (Persian).
46. Abbassi Daloui A, Ziaolhagh SJ, Fazelniya M. The effects of 6 weeks of endurance training and consumption of different doses of boldenone on hematological factors and spleen structure changes in male Wistar rats. *Qom Univ Med Sci* 2017; 11(4): 20-31 (Persian).
47. Yahyaei B, Nouri M, Mirfazeli G. Assessment of the Effects of L-Carnitine with Endurance Training After Boldenone use on Testicular Tissue Changes in Male Rats. *J Guil Uni Med Sci* 2019; 28(109): 30-37 (Persian).
48. Yahyaei B, Nouri M, Ramezani M. The effects of anabolic steroids boldenone with 8 weeks aerobic exercise on histopathological changes in cerebellum male wistar rats. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2019; 25(6): 885-894 (Persian).
49. Sadowska-Krępa E, Kłapińska B, Nowara A, Jagsz S, Szoltysek-Bołdys I, Chalimoniuk M, et al. High-dose testosterone supplementation disturbs liver pro-oxidant/antioxidant balance and function in adolescent male Wistar rats undergoing moderate-intensity endurance training. *Peer J* 2020; 8: e10228.
50. Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Med Hypotheses* 2016; 93: 150-153.
51. Marshall-Gradisnik S, Green R, Brenu E, Weatherby R. Anabolic androgenic steroids effects on the immune system: a review. *Cent Eur J Biol* 2009; 4(1): 19-33.
52. Rasmussen JJ, Selmer C, Østergren PB, Pedersen KB, Schou M, Gustafsson F, et al. Former abusers of anabolic androgenic steroids exhibit decreased testosterone levels and hypogonadal symptoms years after cessation: a case-control study. *PloS One* 2016; 11(8): e0161208.
53. Oda SS, El-Ashmawy IM. Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits. *Int J Exp Pathol* 2012; 93(3): 172-178.
54. Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT, Müller J, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(9): 2904-2910.
55. Maddah M, Jazayeri A, Mirdamadi R, Eshraghiyan MR, Jalali M. Sex hormones, leptin and anthropometric indices in men. *J Reprod Infertil* 2001; 2(2): 4-13.
56. Von Sobbe HU, Koebnick C, Jenne L, Kieseewetter F. Leptin concentrations in semen are correlated with serum leptin and elevated in hypergonadotrophic hypogonadism. *Andrologia* 2003; 35(4): 233-237.
57. Niedfeldt MW. Anabolic steroid effect on the liver. *Curr Sports Med Rep* 2018; 17(3): 97-102.
58. Thulin P, Nordahl G, Gry M, Yimer G, Aklillu E, Makonnen E, et al. Keratin-18 and micro RNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int* 2014; 34(3): 367-378.
59. Pashayi P, Abbassi Daloui A, Barari AR, Mir Javadi SR. The Effect of Endurance Training

- and L-Carnitine Supplementation on Gene Expression of Hepatic Enzymes (AST, ALT, ALP) in Wistar Male Rats Toxicated by Boldenone. *JABS* 2019; 9(4): 1710-1718.
60. Alie M, Matinhommae H, Azarbayjani M, Peeri M. The effect of resistance training intensity on enzymatic and nonenzymatic markers of liver function in obese males. *Ind J Fundam Appl Life Sci* 2015; 5(2):101-110.
 61. Amirkhani Z, Azarbayjani MA, Homaei HM, Peeri M. Effect of combining resistance training and curcumin supplementation on liver enzyme in inactive obese and overweight females. *IJDO* 2016; 8(3): 107-114.
 62. Levinger I, Goodman C, Peake J, Garnham A, Hare DL, Jerums G, et al. Inflammation, hepatic enzymes and resistance training in individuals with metabolic risk factors. *Diabet Med* 2009; 26(3): 220-227.
 63. Slentz CA, Bateman LA, Willis LH, Shields AT, Tanner CJ, Piner LW, et al. Effects of aerobic vs. resistance training on visceral and liver fat stores, liver enzymes, and insulin resistance by HOMA in overweight adults from STRRIDE AT/RT. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(5): E1033-E1039.
 64. Damor K, Mittal K, Bhalla AS, Sood R, Pandey RM, Guleria R, et al. Effect of progressive resistance exercise training on hepatic fat in Asian Indians with non-alcoholic fatty liver disease. *British Journal Of Medicine And Medical Research* 2014; 4(1): 114-124.
 65. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut* 2011; 60(9): 1278-1283.
 66. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Zvibel I, Goldiner I, et al. Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Hepatology* 2008; 48(6): 1791-1798.
 67. Arazi H, Rahmati S, Ghafoori H. The interaction effects of resistance training and sustanon abuse on liver antioxidant activities and serum enzymes in male rats. *Interv Med Appl Sci* 2017; 9(3): 178-183.
 68. Parastesh M, Nadi Z. The Effects of Regular Resistance Training on the Liver's Inflammatory Indexes, Chemerin, Resistin, and Insulin Resistance Index in Healthy and Type 2 Diabetic Male Rats. *J Arak Uni Med Sci* 2020; 23(1): 48-59 (Persian).
 69. Bashiri J, Hadi H, Bashiri M, Nikbakht H, Gaeini A. Effect of concurrent creatine monohydrate ingestion and resistance training on hepatic enzymes activity levels in non-athlete males. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2010; 12(1): 42-47 (Persian).