

Effect of Eight Weeks of High-Intensity Interval Swimming on Visceral Adipose Tissue Asprosin and Serum Adiponectin in Rats with High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis

Seyed Mohammad Nabi Bahrani¹

Saleh Rahmati²

Vahid Moqadam³

¹ PhD Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sports Sciences, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Physical Education and Sports Sciences, Faculty of Physical Education, Campus Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Physical Education and Sports Sciences, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

(Received January 31, 2024 ; Accepted October 2, 2024)

Abstract

Background and purpose: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common metabolic diseases worldwide. Asprosin has been identified as a novel adipokine closely associated with hepatic glucose metabolism, but limited information is available regarding its role and the effect of exercise on it. Insulin resistance is a key factor in the pathogenesis of NAFLD, particularly in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Adiponectin, the most abundant fat-specific adipokine, plays a crucial role in reducing hepatic and systemic insulin resistance, as well as liver inflammation and fibrosis. Adiponectin levels are predictive of the degree of steatosis and the severity of NASH. While there is no proven pharmacological treatment for NASH, recent therapeutic strategies have focused on indirectly regulating adiponectin through the administration of various therapeutic agents and/or lifestyle modifications. Therefore, the aim of the present study was to examine the effect of eight weeks of high-intensity intermittent swimming training on visceral adipose tissue asprosin protein and serum adiponectin in rats with NASH induced by a high-fat diet.

Materials and methods: Forty male Sprague-Dawley rats were divided into two groups: diseased (high-fat diet) (N=20) and healthy (N=20). For eight weeks, the diseased group received a high-fat diet in the form of a daily emulsion (10 ml/kg) via gavage, while the healthy group received an equivalent amount of saline solution. After eight weeks, and confirmation of the disease, the rats were further divided into four subgroups: healthy-control (N=9), healthy-swimming (N=9), diseased-control (N=9), and diseased-swimming (N=9). The swimming groups performed a high-intensity swimming interval training protocol three times per week for eight weeks, while the high-fat diet continued for the diseased groups throughout the training period. At the end of the study, serum adiponectin levels were measured using the ELISA method, and asprosin protein levels in visceral adipose tissue were measured using western blotting. The Shapiro-Wilk test was used to confirm the normality of the data distribution, and one-way ANOVA was used to compare group differences. If significant, Bonferroni's post hoc test was applied to identify pairwise differences. All statistical analyses were performed using SPSS version 26.

Results: The findings showed a significant increase in serum adiponectin levels in the diseased-swimming group compared to the diseased-control group ($P=0.022$). A significant increase in serum adiponectin was also observed in the healthy-swimming group compared to the healthy-control group ($P=0.008$). In terms of asprosin protein levels in visceral adipose tissue, a significant decrease was found in the healthy-swimming group compared to the diseased-control group ($P=0.001$). In the diseased-swimming group, asprosin protein levels decreased compared to the diseased-control group, but this reduction was not statistically significant ($P=0.946$).

Conclusion: In conclusion, despite the continuous consumption of a high-fat diet in the diseased group, high-intensity interval swimming exercises were able to improve two key markers of NASH: increasing adiponectin levels and decreasing asprosin levels. These changes suggest that such exercises could potentially reduce inflammation and insulin resistance in NASH. However, as this research is among the first to examine the effects of high-intensity interval swimming on these two variables in a progressive NASH model, further research is required to draw definitive conclusions.

Keywords: non-alcoholic steatohepatitis, exercise, adiponectin, asprosin, insulin resistance

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (237): 1-13 (Persian).

Corresponding Author: Saleh Rahmati - Faculty of Physical Education, Campus Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. (E-mail: : Rahmatisalehrahmati@pardisiau.ac.ir)

تاثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا بر پروتئین آسپرو سین بافت چربی احشایی و آدیپونکتن سرم خون در موش های صحرایی مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده با رژیم پرچرب

سید محمد نبی بحرانی^۱صالح رحمتی^۲وحید مقدم^۳

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یکی از شایع ترین بیماری های متابولیکی در سراسر جهان است. آسپرو سین به عنوان یک آدیپو کین جدید می باشد که ارتباط نزدیکی با متابولیسم گلوکز کبدی دارد. با این حال، اطلاعات کمی در مورد آن و تاثیر فعالیت ورزشی بر آن وجود دارد. هم چنین مقاومت به انسولین یک عامل کلیدی در پاتوژنز NAFLD و به خصوص بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) است. آدیپونکتن فراوان ترین آدیپو کین مخصوص چربی است. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد آدیپونکتن؛ مقاومت به انسولین کبدی، مقاومت به انسولین به صورت سیستماتیک، التهاب و فیروز کبد را کاهش می دهد. به طور کلی آدیپونکتن درجه استئاتوز و شدت NASH را پیش بینی می کند. اگرچه هیچ درمان دارویی اثبات شده ای برای درمان NASH وجود ندارد، استراتژی های درمانی اخیر بر روی تنظیم غیرمستقیم آدیپونکتن از طریق تجویز عوامل مختلف درمانی و/یا اصلاح شیوه زندگی متمرکز شده اند. از این رو هدف از مطالعه حاضر تاثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا بر پروتئین آسپرو سین بافت چربی احشایی و آدیپونکتن سرم خون در موش های صحرایی مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده با رژیم پرچرب بوده است.

مواد و روش ها: تعداد ۴۰ سر رت نر از نژاد اسپراگ داولی به دو گروه بیمار (رژیم پرچرب) (۲۰ سر) و سالم (۲۰ سر) تقسیم شدند. به مدت هشت هفته رژیم پرچرب به صورت امولسیون روزانه (۱۰ ml/kg) به گروه بیمار و به گروه سالم نیز همین مقدار محلول سالین گاواژ شد. پس از پایان هشت هفته و اثبات بیماری گروه ها هر کدام به دو گروه مجزا شامل کنترل-سالم (۹ سر)، شنا-سالم (۹ سر)، کنترل-بیمار (۹ سر) و شنا-بیمار (۹ سر) تقسیم شدند. سپس به مدت هشت هفته، سه روز در هفته پروتکل تمرین تناوبی شنا با شدت بالا را گروه های تمرین انجام دادند و رژیم پرچرب برای گروه های بیمار تا پایان دوره تمرینات ادامه داشت. پس از پایان تمرین، آدیپونکتن سرم خون با استفاده از روش الایزا و پروتئین آسپرو سین بافت چربی احشایی با روش وسترن بلات اندازه گیری شدند. ابتدا با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک، طبیعی بودن توزیع داده ها اثبات و سپس با استفاده از آمار استنباطی از شیوه آزمون آنوای یک طرفه برای تعیین تفاوت بین گروهی و در صورت معنی دار بودن با استفاده از آزمون تعقیبی بونفرونی تفاوت های درون گروهی به صورت دوجه دو مشخص شد. تمام مراحل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۶ محاسبه گردید.

یافته ها: یافته های تحقیق حاضر نشان داد در متغیر آدیپونکتن سرم؛ در گروه شنا- بیمار نسبت به کنترل- بیمار ($P=0/022$) افزایش معنی دار وجود داشت. هم چنین در گروه شنا- سالم نسبت به گروه کنترل- سالم ($P=0/008$) افزایش معنی دار آدیپونکتن سرم مشاهده شد. سطح پروتئین آسپرو سین بافت چربی احشایی در گروه شنا- سالم نسبت به کنترل- بیمار ($P=0/001$) کاهش معنی دار داشت و در گروه شنا- بیمار نسبت به کنترل- بیمار ($P=0/946$) سطح این پروتئین کاهش غیرمعنی دار یافته بود.

استنتاج: در مجموع می توان گفت در این تحقیق علی رغم مصرف دائم رژیم پرچرب در گروه بیمار مورد مطالعه؛ تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا توانست دو شاخص اصلی بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی را بهبود بخشد به طوری که منجر به افزایش آدیپونکتن و کاهش آسپرو سین شود و با این تغییرات می توان گفت احتمالاً این نوع تمرینات می تواند التهاب و مقاومت به انسولین را در این نوع بیماری بهبود دهد؛ با این وجود چون تحقیق حاضر از اولین تحقیقات در زمینه تاثیر فعالیت های تناوبی شنا با شدت بالا بر این دو متغیر در مدل بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی پیشرونده بوده است؛ برای حصول نتایج قطعی نیازمند تحقیقات بیش تر است.

واژه های کلیدی: استئاتوهپاتیت غیرالکلی، فعالیت ورزشی، آدیپونکتن، آسپرو سین، مقاومت به انسولین

E-mail: Rahmatisahrahmati@pardisiu.ac.ir

مؤلف مسئول: صالح رحمتی - تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پردیس، دانشکده تربیت بدنی

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه آموزشی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه آموزشی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه آموزشی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۲/۰۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۰۷/۱۱

مقدمه

حدود یک سوم از جمعیت بزرگسال جهان مبتلا به بیماری کبد چرب غیر الکلی (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) هستند. طیف وسیعی از این بیماری شامل استئاتوز ساده، استئاتوهپاتیت غیر الکلی (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH)، سیروز و در نهایت سرطان سلول‌های کبدی می‌باشد (۱). عموماً NASH با مقاومت به انسولین و التهاب همراه است (۲). بخشی از آدیپوکین‌ها از جمله آدیپونکتین به طور مستقیم یا غیرمستقیم بر متابولیسم گلوکز، لیپید و حساسیت به انسولین از طریق تعدیل سیگنال‌دهی انسولین تأثیر می‌گذارند (۳).

نقش حساس آدیپونکتین در تأثیر بر حساسیت به انسولین تا حدی به دلیل اتصال آن به گیرنده‌های همزاد مانند گیرنده آدیپونکتین (AdipoR) یک و دو (AdipoR1 و AdipoR2) است که متعاقباً منجر به فعال شدن AMPK و گیرنده‌های فعال کننده پراکسی‌زوم (PPAR) مسیر سیگنالینگ آلفا می‌شود (۴). علاوه بر این، آدیپونکتین به دلیل افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد (FFA)، اثر ضد استئاتوزی روی سلول‌های کبدی دارد و هجوم FFA (Free fatty acid)، لیپوژن de novo و گلوکونئوژن را کاهش می‌دهد (۵). قابل ذکر است که آدیپونکتین با مهار کیناز ترمنال c-Jun NH2 از بروز آپوپتوز در سلول‌های کبدی محافظت می‌کند (۶). آدیپونکتین با وجود اثر بر سلول‌های ستاره‌ای، کوپفر و احتمالاً سلول‌های سینوزوئیدی، اثر ضدالتهابی و ضدفیبروتیک دارد (۷). در موش‌ها، تجویز آدیپونکتین اثرات کاهش دهنده گلوکز را نشان می‌دهد و مقاومت به انسولین را بهبود می‌بخشد، در حالی که موش‌های دارای کمبود آدیپونکتین از مقاومت به انسولین و دیابت رنج می‌برند (۸). سطوح بالای آدیپونکتین با کاهش قابل توجه خطر نسبی دیابت نوع دو همراه می‌باشد (۹). سطوح آدیپونکتین در گردش و هم‌چنین بیان AdipoR1/R2 در شرایط چاقی، دیابت نوع دو و استئاتوهپاتیت

غیر الکلی کاهش می‌یابد (۱۰). آسپرو سین به عنوان یک آدیپو کاین، هورمون پپتیدی جدیدی است که در تنظیم سطح گلوکز نقش دارد (۱۱). آسپرو سین عمدتاً توسط سلول‌های بافت چربی سفید در جریان خون ترشح می‌شود و کبد را در جهت افزایش گلوکز پلاسما و غلظت انسولین ناشتا هدف قرار می‌دهد (۱۲). افزایش پاتولوژیک آسپرو سین در انسان و موش‌های مبتلا به مقاومت به انسولین مشاهده شده است و از دست رفتن عملکرد آن از طریق روش‌های ایمونولوژیک یا ژنتیکی، باعث کاهش ترشح گلوکز کبدی می‌شود (۱۱). تعداد محدودی از مطالعات نقش آسپرو سین را در بیماری‌های مرتبط با استئاتوهپاتیت غیر الکلی ارزیابی کرده‌اند (۱۳-۱۱). پیشنهاد شده است که هدف‌گیری درمانی آسپرو سین ممکن است در دیابت نوع دو و NASH مفید باشد (۱۱). کاهش کالری دریافتی و انجام تمرینات ورزشی به عنوان راهبردهای درمانی غیر دارویی برای کنترل تعادل انرژی و کبد چرب غیر الکلی شناخته می‌شوند (۱۴، ۲). در بررسی انجام شده نشان داده شد که تلاش بی‌هوازی باعث افزایش سطح ترشح آسپرو سین و آیریزین در افراد سالم می‌گردد (۱۵). سطح آسپرو سین با میزان چربی احشایی سطح مقاومت به انسولین و سایتوکاین‌های التهابی همبستگی مثبت دارد با این وجود فعالیت ورزشی طولانی مدت تأثیری بر سطح آسپرو سین نداشته است (۱۶). با این حال آسپرو سین با فعالیت ورزشی تنظیم می‌شود و اثر تنظیمی حیاتی بر بهبود اختلالات متابولیک از طریق فعالیت ورزشی دارد (۱۷). هم‌چنین فعالیت ورزشی باعث ایجاد اثرات مثبت بر عملکرد آدیپونکتین و بهبود مقاومت به انسولین می‌شود (۱۸). با این حال برخی محققان بیان کردند که فعالیت ورزشی به تنهایی نمی‌تواند باعث بهبود عملکرد آدیپونکتین در افراد چاق و اضافه وزن گردد (۱۹). در نتیجه می‌توان گفت نتایج متناقضی درباره تأثیر فعالیت ورزشی بر این دو پروتئین وجود دارد. هم‌چنین اکثر تحقیقات اثرات فعالیت ورزشی را در محیط خشکی مورد بررسی قرار داده‌اند و تحقیقات

بسیار اندکی در زمینه تأثیر فعالیت‌های ورزشی تناوبی با شدت بالا در محیط آبی بر بیماران مبتلا به استئاتوهایپاتیت غیرالکلی وجود دارد. از این رو می‌توان گفت تحقیق حاضر؛ جزء اولین تحقیقاتی است که نقش ورزش شنای تناوبی با شدت بالا بر سطح آدیپونکتین و آسپروسین در بیماران مبتلا به NASH مورد ارزیابی قرار می‌دهد. در نتیجه هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا بر پروتئین آسپروسین بافت چربی احشایی و آدیپونکتین سرم خون در موش‌های صحرایی مبتلا به استئاتوهایپاتیت غیرالکلی القا شده با رژیم پرچرب بوده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر با توجه به هدف از نوع توسعه‌ای و با در نظر گرفتن روش از نوع تجربی بوده است. در این پژوهش، ۴۰ سر موش صحرایی نر (سن: هشت هفته) از نژاد Sprague-Dawley با میانگین وزن 230 ± 20 گرم انتخاب شدند. موش‌های صحرایی در حیوان‌خانه دانشگاه شیراز با دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲ نگهداری شدند. غذای حیوانات به صورت آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه شیراز تهیه شد. هم‌چنین آب مورد نیاز حیوانات به صورت آزادانه در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آن‌ها قرار داده شد. اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه شیراز با کد (IR.US.PSYEDU.REC.1402.072) مورد توجه قرار گرفت. موش‌های صحرایی انتخاب شده به دو گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند. گروه اول گروه سالم، ماندند (n=۲۰) و غذای استاندارد دریافت کردند. گروه دوم طی مدت هشت هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (High fat diet: HFD) قرار گرفتند تا بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی در آن‌ها القا شود (HFD: n=۲۰). رژیم

پرچرب به کار رفته در تحقیق حاضر به صورت امولسیون (به حالت مایع با ویسکوزیته بالا) استفاده شد و با استفاده از روش گاواژ روزانه (به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به موش‌های صحرایی گروه رژیم غذایی پرچرب (n=۲۰) خورانده شد. محتوای امولسیون پرچرب از ۷۷ درصد چربی، ۱۴ درصد پروتئین و ۹ درصد کربوهیدرات‌ها تشکیل گردید. محتوای این امولسیون شامل روغن ذرت، ساکارز، پودر شیر خشک، کلسترول، سدیم دزوکسی کولات، توئین ۸۰، پروپیلین گلایکول، مخلوط ویتامین و مواد معدنی و آب مقطر بود. در این امولسیون، پروتئین‌ها توسط پودر شیر خشک، کربوهیدرات‌ها توسط ساکاروز و چربی توسط روغن ذرت و پودر کلسترول تأمین شدند. هر وعده با مخلوطی از ویتامین و مواد معدنی تکمیل شد. این امولسیون در دمای چهار درجه سانتی‌گراد ذخیره، در حمام آب با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گرم و قبل از استفاده کاملاً میکس و مخلوط شد (۲۰). در گروه رژیم پرچرب علاوه بر غذای روزانه استاندارد جوندگان، به صورت خوراکی و توسط تکنیک گاواژ، موش‌های صحرایی با امولسیون پرچرب (۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) یک بار در روز تحت گاواژ قرار گرفتند. این شیوه تغذیه‌ای به مدت هشت هفته ادامه داشت تا بر اساس پژوهش زو (Zou) و همکاران (۲۰۰۶)، در موش‌های صحرایی که رژیم غذایی پرچرب مصرف می‌کردند (HFD: n=۲۰) بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی القا شود (۲۰). به موش‌های صحرایی گروه سالم (n=۲۰) نیز از طریق تکنیک گاواژ، روزانه مقدار مساوی محلول نمک (سالین) داده شد.

برای اثبات القا بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی، در پایان هشت هفته اول، به طور تصادفی دو رت از هر گروه انتخاب و تشریح شدند. گروه بیمار (n=۲) و سالم (n=۲) و پس از این که نمونه خون از قلب آن‌ها گرفته شد، بافت کبد آن‌ها استخراج شد و از نظر ماکروسکوپی (نمای ظاهری کبد) و میکروسکوپی

(perisinusoidal)؛ درجه دو، متوسط، منطقه ۳، پری سینوزوئیدال؛ درجه سه، پورتال/پری پورتال و درجه چهار، فیروزیس (bridging fibrosis) (۲۲).

پس از اثبات القا بیماری در موش‌های صحرایی (یافته‌های مربوط به اثبات بیماری در قسمت نتایج آمده است)، گروه بیمار (رژیم پرچرب) به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل-بیمار ($n=9$)، تمرین-بیمار ($n=9$) و گروه سالم نیز به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل-سالم ($n=9$)، گروه تمرین-سالم ($n=9$) تقسیم شدند. لازم به ذکر است رژیم غذایی پرچرب گروه‌های بیمار تا پایان دوره تمرینات ادامه داشت. پس از تقسیم‌بندی گروه‌ها، همه موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین به مدت دو هفته مرحله آشنایی با استخر حیوانات (قطر ۱۶۰ سانتی متر و ارتفاع ۸۰ سانتی متر) را قبل از شروع تمرین اصلی گذراندند (۲۳). در هفته اول موش‌های صحرایی با نهایت دقت و آرامش در استخر حیوانات با عمق آب ۵۰ سانتی متر و میانگین دمای 30 ± 0.5 درجه سانتی گراد قرار گرفتند و با سرعت دلخواه به مدت ۲۰ دقیقه به‌طور متناوب شنا کردند. در هفته دوم وقتی که موش‌های صحرایی به‌خوبی با استخر حیوانات آشنا شدند؛ برای آشنایی با نوع تمرین تناوبی، چندین مرتبه بعد از یک دقیقه شنا به وسیله صفحه استراحت از آب بیرون آورده و دوباره در آب قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان آخرین جلسه آشنایی، موش‌های صحرایی گروه تمرین، ابتدا پنج دقیقه گرم کردن و سپس تمرین اصلی (High intensity interval training) HIIT (شنا، شامل ۲۰ نوبت ۳۰ ثانیه‌ای شنا با ۳۰ ثانیه استراحت بین هر نوبت را انجام دادند. در پایان هر برنامه تمرینی نیز پنج دقیقه عمل سرد کردن اعمال شد و سپس تمام موش‌های صحرایی کاملاً خشک شده و به قفس‌هایشان منتقل شدند. این برنامه ورزشی به مدت هشت هفته (سه روز در هفته، روزهای زوج) انجام شد. در تمرین تناوبی بار اعمال شده در هفته اول، وزنه‌ای به میزان هفت درصد وزن بدن هر موش صحرایی بود و هر هفته یک درصد به آن

(از طریق رنگ آمیزی Oil red O) و هم‌چنین از نظر بیوشیمیایی (سنجش مقادیر ALT و AST سرم خون) مورد بررسی قرار گرفتند. برای سنجش میزان ALT و AST سرم خون، به ترتیب از کیت سنجش ALT (شرکت پارس آزمون، ساخت ایران) و کیت سنجش AST (شرکت پارس آزمون، ساخت ایران) استفاده شد (۲). رنگ آمیزی Oil red O: بافت کبد که قبلاً در نیتروژن مایع خنک شده بود در ایزوپنتان (isopentane) غوطه‌ور شد و در دمای برش بهینه Tissue-Plus® (OCT) (Fisher HealthCare™) قرار داده شد و متعاقباً برای تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی مورفولوژی کبد و محتوای چربی؛ ذخیره شد. نمونه‌های کبد بر روی یک کرایواستات (Leica Microsystems, CM3050S)، ساخت کشور آلمان) به برش‌هایی به ضخامت پنج میکرومتر برش داده شدند. مقاطع کبد با Oil Red O (105230, Merck, Darmstadt, Germany) رنگ آمیزی شدند. تصاویر زیر یک میکروسکوپ نوری (Olympus, CX22)، توکیو، ژاپن) مشاهده شد و از یک میدان تصادفی 40X از کبد هر حیوان با استفاده از نرم‌افزار (Toup View) (ToupTek Photonics, Zhejiang, China) گرفته شد (۲۱).

یک میدان میکروسکوپی نوری در هر بخش مشاهده شد و برای شدت استئاتوز کبدی، التهاب و فیروز براساس معیارهای زیر نمره گذاری شد:

برای استئاتوز کبدی: درجه صفر، بدون چربی؛ درجه یک، استئاتوز کم‌تر از ۳۳ درصد؛ درجه دو، ۳۴ تا ۶۶ درصد از پارانشیم کبدی و درجه سه، بیش از ۶۶ درصد از پارانشیم کبدی را اشغال می‌کند.

برای انفیلتراسیون التهاب سلولی: درجه صفر، هیچ foci/field؛ درجه یک، ۱-۲ foci/field؛ درجه دو، ۳-۴ foci/field و درجه سه، بیش از ۴ foci/field.

مرحله‌بندی فیروز کبدی با رنگ آمیزی Oil red O به شرح زیر بررسی شد: درجه صفر، هیچ؛ درجه یک، خفیف، منطقه (zone) ۳، پری سینوزوئیدال

اضافه شد؛ به طوری که در هفته آخر (هشتم) موش‌های صحرایی با وزنه‌ای به میزان ۱۴ درصد وزن بدن خود که به ریشه دم آن‌ها بسته شد، شنا کردند (جدول شماره ۱) (۲۴). تمرینات، عصر هنگام (بهترین زمان تمرین در ریتم فعالیت طبیعی موش‌های صحرایی) انجام شد (۲۵).

جدول شماره ۱: پروتکل تمرینی شنا با شدت بالا (یک روز در میان، روزهای زوج)

هفته‌ها	تعداد (نوبت)	مدت تلاش (ثانیه)	مدت استراحت (ثانیه)	میزان اضافه بار (درصد وزن بدن)
هفته اول	۲۰	۳۰	۳۰	۷
هفته دوم	۲۰	۳۰	۳۰	۸
هفته سوم	۲۰	۳۰	۳۰	۹
هفته چهارم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۰
هفته پنجم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۱
هفته ششم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۲
هفته هفتم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۳
هفته هشتم	۲۰	۳۰	۳۰	۱۴

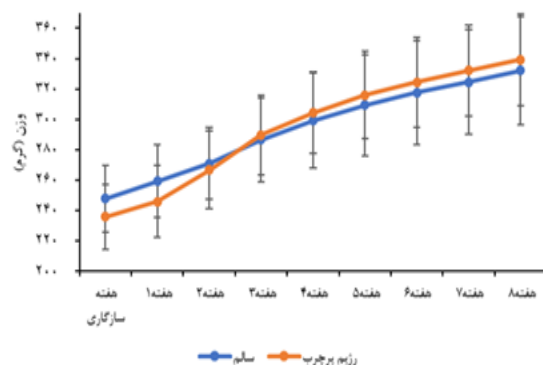
وزن موش‌های صحرایی از روز اول شروع دوره تحقیق و سپس هر هفته در روزهای جمعه، عصر هنگام مورد سنجش قرار می‌گرفت و تا پایان دوره تحقیق و روز تشریح این روند ادامه داشت. پس از به دست آوردن وزن هر یک از موش‌های صحرایی در هر گروه، میانگین وزنی هر گروه مشخص شده و ثبت می‌شد. یافته‌های مربوط به میانگین وزن گروه‌های تحقیق در نمودارهای شماره ۱ و ۲، قسمت نتایج گزارش شده است. در مدت دوره تداخل، گروه‌های کنترل-سالم و کنترل-بیمار هیچ گونه برنامه تمرینی نداشتند. برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، بعد از ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (سه تا پنج میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. ابتدا نمونه‌های خونی از قلب رت‌ها به میزان ۵ سی‌سی گرفته شد؛ بلافاصله آن را در داخل لوله آزمایش ژل کلات اکتیوتر انتقال داده و سپس توسط سانتریفیوژ با سرعت

۳۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن توسط سمپلر به میکروتیوب‌های ۲ سی‌سی سرم خون منتقل شد و برای آنالیز نهایی در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هم‌چنین بافت چربی احشایی از ناحیه شکمی جدا و پس از شست‌وشو با نرمال سالین، بلافاصله در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای آنالیزهای بعدی آماده شود. اندازه‌گیری آدیپونکتین به روش الیزا (کیت Rat Total Adiponectin/Acrp30 Immunoassay، شرکت Quantikine® ELISA) و اندازه‌گیری آسپروسین به روش وسترن بلات (آنتی بادی اولیه anti-Asprosin antibody، شرکت Fine test® و آنتی بادی ثانویه m-IgGk BP-HRP: sc-516102، شرکت mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357، SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. بتا-اکتین (C4): sc-47778، β -Actin، شرکت SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. انجام شد. به طور کلی مراحل انجام تکنیک وسترن بلات به ترتیب شامل لیز کردن بافت، تعیین غلظت پروتئین به وسیله برادفورد، تهیه غلظت‌های مختلف BSA برای کشیدن منحنی استاندارد، غلظت‌های پروتئین، آب و سمپل بافر، آماده‌سازی نمونه، ساخت الکتروفورز بر روی ژل SDS page، تهیه محلول‌ها، روش انجام آزمایش و ساختن ژل پایین و بالا، الکتروفورز بر روی ژل SDS page، وسترن بلات یا ایمنوبلاستینگ، مرحله انتقال از ژل به کاغذ، مرحله بلاکینگ، مرحله انکوبه کردن با آنتی‌بادی اولیه، مرحله انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه، مرحله آشکارسازی، مرحله ظهور فیلم در تاریک‌خانه، روش Striping بود. در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی، میانگین، انحراف استاندارد و نمودار و در بخش آمار استنباطی اطلاعات جمع‌آوری شده برای تعیین نحوه توزیع داده‌ها از آزمون شپرو-ویلک استفاده شد. در صورت طبیعی بودن

یافته‌ها، از روش تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و در صورت معنی دار بودن تفاوت‌ها، از آزمون تعقیبی بونفرونی برای تعیین محل دقیق تفاوت‌ها استفاده شد. سطح معنی داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته و کلیه روش‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS version 26 انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2019 کمک گرفته شد.

یافته‌ها

در نمودار شماره ۱ میانگین $\pm$ انحراف استاندارد وزن گروه‌های سالم ($n=20$) و رژیم پرچرب (HFD) ($n=20$)، در مدت هشت هفته القا رژیم پرچرب نمایش داده شده است. یافته‌ها نشان دادند تفاوت معنادار میان این دو گروه در مدت هشت هفته وجود نداشته است ($P=0.841$).



نمودار شماره ۱: میانگین $\pm$ انحراف استاندارد تغییرات وزن گروه‌های سالم و رژیم پرچرب در هشت هفته اول القا کبد چرب، در ابتدا یک هفته به عنوان سازگاری رت‌ها با محیط آزمایشگاه و رژیم غذایی در نظر گرفته شد عدم تفاوت معنادار میان وزن دو گروه در مدت هشت هفته ($P=0.841$).

همان گونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است در نمونه‌های بیمار ۱ و ۲ پس از هشت هفته تغذیه با رژیم پرچرب نمره استئاتوزیس و التهاب، مقادیر سرمی ALT و AST و همچنین آنالیز بافتی کبد نشان داد که کبد رت‌ها در مرحله دوم فیروزیس قرار دارد. در تصویر شماره ۱ کبد بیمار با کبد سالم از نظر ظاهری با هم مقایسه شده است و مشخص است که رنگ کبد

بیمار به دلیل تجمع بالای تری گلیسیرید در آن متمایل به سفید و رنگ کبد سالم به دلیل عدم تجمع تری گلیسیرید به رنگ قرمز می‌باشد. در تصویر شماره ۲ نتایج رنگ آمیزی Oil red O بافت کبد بیمار و سالم با هم مقایسه و گزارش شده است. همان گونه که مشهود است تعداد نقطه‌های قرمز رنگ در نمونه کبد بیمار نشان دهنده میزان تجمع تری گلیسیرید در این بافت است با این حال در نمونه کبد سالم هیچ نوع نقطه قرمز رنگی مشاهده نمی‌شود و نشان دهنده عدم تجمع تری گلیسیرید در نمونه بافت کبد سالم است.

جدول شماره ۱: نتایج آزمایش بافتی و خونی جهت اثبات بیماری استئاتوهپاتیت غیر الکلی

شماره رت	نمره استئاتوزیس	نمره التهاب	مرحله فیروزیس	ALT	AST
۱ (بیمار) [*]	۲.۳۳	۰.۳	۲	۶۴/۵۴	۶۰/۹
۲ (بیمار) [*]	۲.۷۵	۰.۸	۲	۶۸/۷	۶۷/۸۴
۱ (سالم)	۰	۰	۰	۴۶/۳	۴۱/۲۱
۲ (سالم)	۰	۰	۰	۴۰/۳۹	۳۸/۴۱



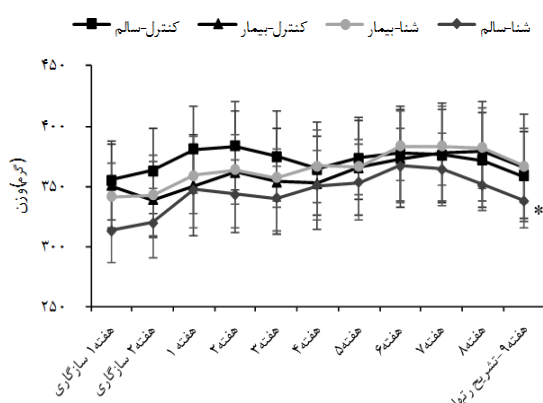
A



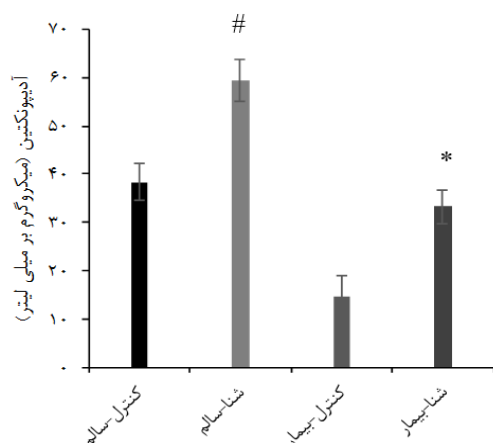
B

تصویر شماره ۱: مقایسه نمای ظاهری کبد سالم (A) و کبد چرب (B)، بلافاصله پس از کشتار در گروه سالم و بیمار. همان گونه که مشهود است رنگ ظاهری کبد چرب (B) نسبت به کبد سالم (A) به دلیل تجمع چربی بالا سفید است اما رنگ کبد سالم (A) قرمز رنگ و طبیعی است. هم چنین میزان حجم اشغال شده توسط کبد چرب نسبت به کبد سالم بسیار بیش تر است و این موضوع نشان دهنده تورم پاتولوژیک کبد و التهاب آن است.

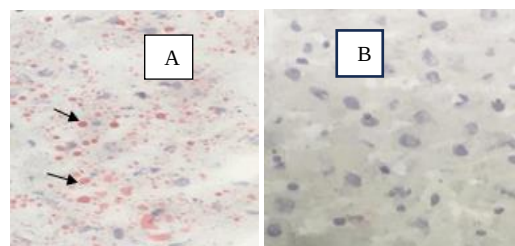
($P=0/001$) به طور معنی داری کمتر شده بود. هم چنین این پروتئین در گروه های شنا- بیمار ($P=0/042$) و کنترل- بیمار ($P=0/001$) نسبت به کنترل- سالم به طور معنی داری بیش تر شده بود. با این حال در گروه شنا- بیمار نسبت به کنترل- بیمار کاهش غیر معنی دار دیده شد ($P=0/946$) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۲: میانگین $\pm$ انحراف استاندارد تغییرات وزن چهار گروه آزمایش در هشت هفته دوم پس از اثبات بیماری استاتوهایت غیرالکلی،*: کاهش معنی دار وزن در گروه شنا- سالم نسبت به کنترل- سالم ($P=0/003$) و کنترل- بیمار ($P=0/002$)



نمودار شماره ۳: تغییرات آدیپونکتین سرم بین گروه های آزمایش،*: افزایش معنی دار گروه شنا- بیمار نسبت به کنترل- بیمار ($P=0/022$), #: افزایش معنی دار گروه شنا- سالم نسبت به گروه های کنترل- سالم ($P=0/008$), کنترل- بیمار ($P=0/001$) و شنا- بیمار ($P=0/001$)

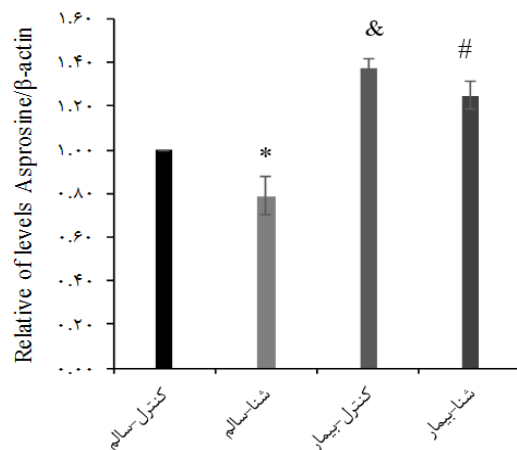


تصویر شماره ۲: رنگ آمیزی بافت کبد توسط Oil red O، A: کبد سالم- به دلیل عدم وجود چربی هیچ نوع رنگ قرمزی به خود نگرفته است. B: کبد چرب، لیپیدها به رنگ قرمز درآمده اند (نمره استاتوزیس: ۲/۷۵، نمره التهاب: ۰/۹، مرحله فیروزیس: ۲).

نمودار شماره ۲، وزن گروه های تحقیق پس از اثبات بیماری استاتوهایت غیرالکلی و تقسیم بندی تصادفی آن ها به چهار گروه کنترل- سالم ($n=9$), شنا- سالم ($n=9$), کنترل- بیمار ($n=9$) و شنا- بیمار ($n=9$), نشان می دهد. بر اساس میانگین وزن هر گروه در کل دوره مداخله تمرینی، به طور کلی کاهش معنی دار وزن در گروه شنا- سالم نسبت به کنترل- سالم ($P=0/003$) و کنترل- بیمار ($P=0/002$) مشاهده شد. کاهش غیر معنی دار گروه شنا- سالم نسبت به شنا- بیمار ($P=0/092$) نیز وجود داشت.

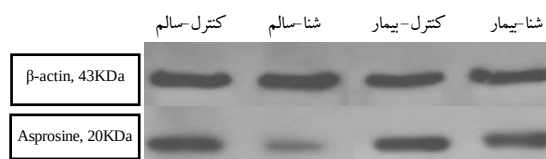
بر اساس نتایج آزمون آنوای یک طرفه میان گروه های آزمایش در متغیر آدیپونکتین سرم تفاوت معنی دار وجود داشت ($P=0/001$). با توجه به نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی، سطح آدیپونکتین در گروه شنا- بیمار نسبت به کنترل- بیمار به طور معنی داری بیش تر شده بود ($P=0/022$). هم چنین آدیپونکتین در گروه شنا- سالم نیز نسبت به گروه های کنترل- سالم ($P=0/008$), کنترل- بیمار ($P=0/001$) و شنا- بیمار ($P=0/001$) به طور معنی داری بیش تر شده بود (نمودار شماره ۳). هم چنین در پروتئین آسپروسین بافت چربی احشایی، میان گروه های آزمایش تفاوت معنی دار وجود داشت ($P=0/001$). پس از مقایسه دوبه دوی گروه ها، پروتئین آسپروسین در گروه شنا- سالم نسبت به گروه های کنترل- بیمار ($P=0/001$) و شنا- بیمار

دادند. هم‌چنین پروتئین آسپروسین در گروه شنا- سالم نسبت به گروه‌های کنترل- بیمار و شنا- بیمار به طور معنی‌داری کمتر بود. هم‌چنین این پروتئین در گروه‌های شنا- بیمار و کنترل- بیمار نسبت به کنترل- سالم به طور معنی‌داری بیش‌تر بود. با این حال در گروه شنا- بیمار نسبت به کنترل- بیمار کاهش غیرمعنی‌دار دیده شد. در تحقیق Ke و همکاران (۲۰۲۰)، میان سطح آسپروسین و شاخص مقاومت به انسولین در بیماران مبتلا به NAFLD همبستگی مثبت یافت شد و این محققین دریافتند که در این بیماری سطح آسپروسین به شدت افزایش می‌یابد (۲۶). حال آن‌که یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت تناوبی شنا با شدت بالا، علیرغم مصرف دائم رژیم پرچرب ۷۷ درصد (عدم حذف عامل بیماری NASH)، موجب جلوگیری از افزایش حاد و حتی کاهش سطح پروتئین آسپروسین می‌گردد؛ در نتیجه می‌تواند به بهبود تنظیم عملکرد آسپروسین و به دنبال آن بهبود تنظیم مقاومت به انسولین در بیماری NASH کمک شایانی کند. هم‌چنین یافته‌های تحقیق حاضر نشان دادند که پروتکل ورزشی به کار رفته در تحقیق حاضر می‌تواند مستقل از کاهش وزن سبب بهبود عوامل موثر در مقاومت به انسولین در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی شود و این نتایج در این نوع بیماری و این نوع پروتکل تمرینی؛ جزو اولین یافته‌های تحقیقات در این زمینه محسوب می‌گردد. یافته‌های تحقیق نخعی و همکاران (۲۰۱۹)، نشان دادند که سطح آسپروسین میان بیماران مبتلا به سندروم متابولیک با گروه کنترل- سالم تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما همسو با یافته‌های تحقیق حاضر، کاهش معنی‌دار آسپروسین در گروه‌های تمرین تداومی شنا و تمرین تناوبی شنا نسبت به گروه کنترل یافتند (۲۷). از جمله دلایل ناهم‌سویی برخی از یافته‌های تحقیق حاضر با یافته‌های نخعی و همکاران (۲۰۱۹) می‌توان به تفاوت در نوع بیماری، نوع پروتکل تمرینی و نوع تغذیه به کار رفته و هم‌چنین نوع بافت مورد نظر و نوع شیوه آزمایشگاهی به کار رفته اشاره



نمودار شماره ۴: غیرات پروتئین آسپروسین میان گروه‌های آزمایش. *: کاهش معنی‌دار گروه شنا- سالم نسبت به گروه‌های کنترل-بیمار ($P=0/001$) و شنا- بیمار ($P=0/001$). # افزایش معنی‌دار در گروه شنا-بیمار نسبت به کنترل- سالم ($P=0/042$). & افزایش معنی‌دار در گروه کنترل-بیمار نسبت به کنترل- سالم ($P=0/001$). کاهش غیرمعنی‌دار گروه شنا-بیمار نسبت به کنترل بیمار ($P=0/946$).

باند‌های پروتئینی آسپروسین بافت چربی حاصل از روش وسترن بلاتینگ نیز نتایج بالا را به صورت کیفی نشان می‌دهند و تایید می‌کنند. شدت رنگ و میزان ضخامت هر باند نسبت به بتا-اکتین نشان‌دهنده غلظت پروتئین آسپروسین در گروه مورد نظر است (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: باند‌های پروتئینی ایجادشده از روش وسترن بلاتینگ به تفکیک هر گروه آزمایش. میزان شدت رنگ و ضخامت باند در مقایسه با بتا-اکتین نشان‌دهنده غلظت پروتئین مورد نظر در هر گروه است.

بحث

یافته‌های تحقیق حاضر کاهش معنی‌دار وزن گروه شنا- سالم نسبت به کنترل- سالم و کنترل- بیمار نشان

کرد. متأسفانه، محققین تحقیق حاضر هیچ گزارشی در مورد تأثیر فعالیت‌های تناوبی شنا با شدت بالا بر غلظت آسپرو سین در موش‌های مبتلا به NASH یافت نکردند. بنابراین تجزیه و تحلیل یافته‌های مطالعه حاضر دشوار است. در مطالعه مدل موش توسط Duerrschmid و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده شده است که غلظت آسپرو سین ممکن است در بیماران چاق و مقاوم به انسولین توسط آنتی‌بادی‌های خنثی شده کاهش یابد، در نتیجه فعالیت نورو نهای AgRp+ را کاهش داده و منجر به کاهش مصرف غذای روزانه شود (۲۸). در مطالعه حاضر، برای اولین بار نشان داده شد که سطوح پروتئینی آسپرو سین بافت چربی احشایی توسط تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا کاهش می‌یابد. بنابراین، به نظر می‌رسد که این نوع تمرینات بر اشتها با کاهش غلظت آسپرو سین در موش‌های مبتلا به بیماری استئاتو هپاتیت غیر الکلی تأثیر می‌گذارند. Zhang و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش کردند که آسپرو سین سرم رابطه قوی با متابولیسم لیپیدها در بیماران مبتلا به دیابت دارد و افزایش آن با پاتوژن اختلال لیپیدها همراه است (۲۹). با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان گفت که علی‌رغم مصرف دائم رژیم پرچرب ۷۷ درصد، پروتکل تمرینی به کار رفته توانسته است از اختلال بیش‌تر متابولیسم لیپید جلوگیری کند و به بهبود آن از طریق کاهش آسپرو سین کمک شایانی کند. Lee و همکاران (۲۰۱۹)، دریافتند که آسپرو سین نو ترکیب التهاب را از طریق سیگنال‌دهی TLR4/JNK تسریع می‌کند و در نتیجه مقاومت به انسولین را گسترش می‌دهد (۳۰، ۳۱). حال آن‌که پروتکل تمرینی به کار رفته از افزایش آسپرو سین جلوگیری کرد و حتی آن را کاهش داد و با توجه به نتایج Lee و همکاران (۲۰۱۹)، احتمالاً شدت التهاب را نیز در بیماری استئاتو هپاتیت غیر الکلی کنترل کرده است.

هم‌چنین بیان شده است که ارزیابی همزمان آسپرو سین و آدیپونکتین ممکن است یک نشانگر تشخیصی زیستی بالقوه در NAFLD و NASH باشد (۲۶).

در این مطالعه، سطح پایین آدیپونکتین در بیماران مبتلا به استئاتو هپاتیت غیر الکلی مشاهده شد که با نتایج تحقیقات قبلی مطابقت داشت، که نشان می‌دهد هیپو آدیپونکتیمی یک عامل خطر احتمالی برای NASH است (۳۲). اثرات درمانی بالا در روش هوازی با شدت‌های متوسط تا زیاد نشان می‌دهد که متغیر شدت، عامل کلیدی در ایجاد تغییر در سطح آدیپونکتین می‌باشد (۳۳). یافته‌های تحقیق حاضر در راستای تحقیقات پیشینه نشان دادند که تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا می‌تواند اثرات افزایشی معنی‌دار در گروه‌های شنا-بیمار و شنا-سالم نسبت به کنترل-بیمار داشته باشد. این در حالی است که در تحقیق حاضر نشان داده شد که بیماری استئاتو هپاتیت پیش‌رونده در گروه کنترل بیمار می‌تواند به‌طور معنی‌داری سطح آدیپونکتین سرم را نسبت به گروه کنترل-سالم و سایر گروه‌ها کاهش دهد. Numao و همکاران (۲۰۱۲)، گزارش کردند که آدیپونکتین می‌تواند غلظت لیپوپروتئین با چگالی بالا را با ترشح و تصفیه آپو پروتئین-۱ در کبد تنظیم کند و باعث باز تنظیم مجدد متابولیسم لیپید و بهبود مقاومت به انسولین شود (۳۴). با توجه به پیشینه تحقیقات در این زمینه می‌توان گفت که با افزایش معنی‌دار سطح آدیپونکتین ناشی از تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا نسبت به گروه کنترل-بیمار، احتمالاً اثرات مثبتی بر متابولیسم لیپید، مقاومت به انسولین و کاهش التهاب گذاشته است زیرا که آسپرو سین نیز که در مقاومت به انسولین نقش اساسی دارد تحت تأثیر افزایش معنی‌دار آدیپونکتین در گروه شنا-بیمار و شنا-سالم، کاهش داشته است. اکثر مطالعات نشان می‌دهد که سطح آدیپونکتین فقط در بیمارانی که کاهش وزن قابل توجهی را تجربه کرده‌اند کاهش می‌یابد (۳۵). با این حال بر خلاف تحقیقات پیشینه، یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد مستقل از تغییرات وزن و هم‌چنین مصرف دائم رژیم پرچرب ۷۷ درصد چربی، تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا توانست افزایش معنی‌دار را در گروه شنا-بیمار نسبت به کنترل-بیمار به وجود آورد و این نتیجه نشان‌دهنده اثربخش

شنا با شدت بالا بر این دو متغیر در مدل بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی پیشرونده بوده است؛ برای حصول نتایج قطعی نیازمند تحقیقات بیش تر است.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله، هیچ نفع متقابلی از انتشار آن ندارند.

سپاسگزاری

از تمامی کسانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

بودن این نوع تمرین در این مدل از بیماری است. در مجموع می توان گفت در این تحقیق علی رغم مصرف دائم رژیم پرچرب در گروه بیمار مورد مطالعه؛ تمرینات تناوبی شنا با شدت بالا توانست دو شاخص اصلی بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی را بهبود بخشد به طوری که منجر به افزایش آدیپونکتین و کاهش آسپروسین شود و با این تغییرات می توان گفت احتمالاً این نوع تمرینات می تواند التهاب و مقاومت به انسولین را در این نوع بیماری بهبود دهد؛ با این وجود چون شاخص های التهابی مورد بررسی قرار نگرفت و تحقیق حاضر از اولین تحقیقات در زمینه تاثیر فعالیتهای تناوبی

References

1. Glass O, Filozof C, Nouredin M, Berner-Hansen M, Schabel E, Omokaro SO, et al. Standardisation of diet and exercise in clinical trials of NAFLD-NASH: Recommendations from the Liver Forum. *J Hepatol* 2020; 73(3): 680-693 PMID: 32353483.
2. Jowhari A, Daryanoosh F, Jahromi MK, Nekooeian AA. Effect of High-intensity Intermittent Swimming Training on peroxisome proliferator-activated receptors- α and Liver Enzymes in Non-alcoholic Steatohepatitis Male Rats. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2023; 30(10): 6034-6051 (Persian).
3. Parra-Peralbo E, Talamillo A, Barrio R. Origin and development of the adipose tissue, a key organ in physiology and disease. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 786129.
4. Kim Y, Park CW. Mechanisms of adiponectin action: implication of adiponectin receptor agonism in diabetic kidney disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20(7): 1782 PMID: 30974901.
5. Khairnar R, Islam MA, Fleishman J, Kumar S. Shedding light on non-alcoholic fatty liver disease: Pathogenesis, molecular mechanisms, models, and emerging therapeutics. *Life Sci* 2023; 312: 121185. PMID: 36375569.
6. Jung TW, Lee YJ, Lee MW, Kim SM, Jung TW. Full-length adiponectin protects hepatocytes from palmitate-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH2 terminal kinase. *FEBS J* 2009; 276(8): 2278-2284. PMID: 19290887.
7. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2016; 65(8): 1062-1079 PMID: 26725002.
8. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423(6941): 762-769. PMID: 12802337.
9. Chakraborti CK. Role of adiponectin and some other factors linking type 2 diabetes mellitus and obesity. *World J Diabetes* 2015; 6(15): 1296-1308. PMID: 26557957.
10. Banerjee A, Sharma D, Trivedi R, Singh J. Treatment of insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes mellitus through

- adiponectin gene therapy. *Int J Pharm* 2020; 583:119357. PMID: 32334065 .
11. Romere C, Duerschmid C, Bournat J, Constable P, Jain M, Xia F, et al. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell* 2016; 165(3): 566-579 PMID: 27087445.
 12. Wang Y, Qu H, Xiong X, Qiu Y, Liao Y, Chen Y, et al. Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with insulin resistance and first-phase insulin secretion. *Mediators Inflamm* 2018; 2018: 9471583. PMID: 29743813.
 13. Alan M, Gurlek B, Yilmaz A, Aksit M, Aslanipour B, Gulhan I, et al. Asprosin: a novel peptide hormone related to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2019; 35(3): 220-223. PMID: 30325247.
 14. Rocha GLd, Crisp AH, De Oliveira MR, Silva CAd, Silva JO, Duarte AC, et al. Effect of high intensity interval and continuous swimming training on body mass adiposity level and serum parameters in high-fat diet fed rats. *Scientific World Journal* 2016; 2016: 2194120.
 15. Wiecek M, Szymura J, Maciejczyk M, Kantorowicz M, Szygula Z. Acute anaerobic exercise affects the secretion of asprosin, irisin, and other cytokines—a comparison between sexes. *Front Physiol* 2018; 9: 1782. PMID: 30618797
 16. Huang R, Song C, Li T, Yu C, Yao T, Gao H, et al. A cross-sectional comparative study on the effects of body mass index and exercise/sedentary on serum asprosin in male college students. *PLoS One* 2022; 17(4): e0265645. PMID: 35381008.
 17. Liu L, Liu Y, Huang M, Zhang M, Zhu C, Chen X, et al. The Effects of Asprosin on Exercise-Intervention in Metabolic Diseases. *Front Physiol* 2022; 13: 907358. PMID: 35899030.
 18. Martinez-Huenchullan SF, Tam CS, Ban LA, Ehrenfeld-Slater P, McLennan SV, Twigg SM. Skeletal muscle adiponectin induction in obesity and exercise. *Metabolism* 2020; 102: 154008. PMID: 31706980.
 19. Khalafi M, Hossein Sakhaei M, Kheradmand S, Symonds ME, Rosenkranz SK. The impact of exercise and dietary interventions on circulating leptin and adiponectin in individuals who are overweight and those with obesity: A systematic review and meta-analysis. *Adv Nutr* 2023; 14(1): 128-146 PMID: 36811585.
 20. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79(11): 1100-1107. PMID: 16624332.
 21. Chen B, Ma Y, Xue X, Wei J, Hu G, Lin Y. Tetramethylpyrazine reduces inflammation in the livers of mice fed a high fat diet. *Mol Med Rep* 2019; 19(4): 2561-2568. PMID: 30720104.
 22. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41(6):1313-1321.
 23. Farzanegi P, Habibian M, Alinejad H. The Combined Effect of Regular Aerobic Exercise with Garlic Extract on Renal Apoptosis Regulatory Factors in Aged rats with Chronic Kidney Disease. *J Arak Univ Med Sci* 2016; 19(3): 62-70 (Persian).
 24. Ramos-Filho D, Chicaybam G, de-Souza-Ferreira E, Guerra Martinez C, Kurtenbach E, Casimiro-Lopes G, et al. High intensity interval training (HIIT) induces specific changes in respiration and electron leakage in

- the mitochondria of different rat skeletal muscles. *PloS One* 2015; 10(6): e0131766. PMID: 26121248.
25. Shafiee A, Kordi M, Gaeini A, Soleimani M, Nekouei A, Hadidi V. The effect of eight week of high intensity interval training on expression of mir-210 and ephrinA3 mRNA in soleus muscle healthy male rats. *J Arak Univ Med Sci* 2014; 17(3): 26-34 (Persian).
 26. Ke F, Xue G, Jiang X, Li F, Lai X, Zhang M, et al. Combination of asprosin and adiponectin as a novel marker for diagnosing non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 2020; 134: 155184. PMID: 32645536.
 27. Nakhaei H, Mogharnasi M, Fanaei H. Effect of swimming training on levels of asprosin, lipid profile, glucose and insulin resistance in rats with metabolic syndrome. *Obesity Medicine* 2019; 15: 100111.
 28. Duerschmid C, He Y, Wang C, Li C, Bournat JC, Romere C, et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med* 2017; 23(12): 1444-1453. PMID: 29106398.
 29. Zhang L, Chen C, Zhou N, Fu Y, Cheng X. Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clin Chim Acta* 2019; 489: 183-188. PMID: 29104036 .
 30. Lee T, Yun S, Jeong JH, Jung TW. Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2019; 486: 96-104. PMID: 30853600.
 31. Jung TW, Kang C, Goh J, Chae SI, Kim HC, Lee TJ, et al. WISP1 promotes non-alcoholic fatty liver disease and skeletal muscle insulin resistance via TLR4/JNK signaling. *J Cell Physiol* 2018; 233(8): 6077-6087.
 32. Zhang H, Niu Y, Gu H, Lu S, Zhang W, Li X, et al. Low serum adiponectin is a predictor of progressing to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Lab Anal* 2019; 33(3): e22709. PMID: 30390352.
 33. Simpson KA, Singh MAF. Effects of Exercise on Adiponectin: A Systematic Review. *Obesity* 2008; 16(2): 241-256.
 34. Numao S, Sasai H, Nomata Y, Matsuo T, Eto M, Tsujimoto T, et al. Effects of exercise training on circulating retinol-binding protein 4 and cardiovascular disease risk factors in obese men. *Obesity Facts* 2012; 5(6): 845-855.
 35. Wang X, Chen X, Zhang H, Pang J, Lin J, Xu X, et al. Circulating retinol-binding protein 4 is associated with the development and regression of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes & Metabolism* 2020; 46(2): 119-128.