DOI: 10.22100/jkh.v4i15.2476

مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

اثر هشت هفته تمرین استقامتی و تزریق قطعه لیپولیتیک هورمون رشد (AOD9604) بر آنزیم‌های کبد و CK18 موش‌های سوری القاء شده به کبد چرب غیرالکلی ناشی از رژیم غذایی پر چرب

محسن دهباشی[۱]، مهرداد فتحی*[۲]، سیدرضا عطارزاده‌حسینی[۳]، محمد مسافری‌ضیاءالدینی[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی و متابولیسم ورزشی- دانشکده علوم ورزشی- دانشگاه فردوسی مشهد- مشهد- ایران.
۲- دانشیار فیزیولوژی ورزشی- دانشکده علوم ورزشی- دانشگاه فردوسی مشهد- مشهد- ایران.
۳- استاد فیزیولوژی ورزشی- دانشکده علوم ورزشی- دانشگاه فردوسی مشهد- مشهد- ایران.
۴- استادیار فیزیولوژی ورزشی- دانشکده علوم ورزشی- دانشگاه فردوسی مشهد- مشهد- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۰، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۲/۰۲

چکیده

مقدمه: *کبد چرب در جامعه جهانی در حال افزایش است، لذا هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین استقامتی، تزریق قطعه لیپولیتیک هورمون رشد (AOD9604-فرگمنت) بر سطوح CK18 و آنزیم‌های کبد موش‌های سوری القاء شده به کبد چرب می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *در این پژوهش تجربی ۲۸ سر موش به چهار گروه هفت‌تایی، کنترل (C)، تمرین (E)، تمرین + فرگمنت (EA)، فرگمنت بدون تمرین (A) تقسیم شدند. برنامه تمرین استقامتی به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته اجرا شد. پروتکل تزریق فرگمنت روزانه ۲۵۰ پیکوگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن در نظر گرفته شد. نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت ارزیابی داده‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس و آزمون تعقیبی توکی استفاده شده.*

نتایج: *CK18 در مقایسه با گروه کنترل در گروه E کاهش معنادار نشان داد ($P<۰/۰۰۱$)؛ شاخص HOMA-IR در دو گروه E ($P<۰/۰۰۱$) و EA ($P=۰/۰۳$) کاهش معنادار داشت، اما در گروه A تغییرات معنادار نبود ($P=۰/۱۵$)؛ تغییرات AST در هیچ یک از گروه‌ها معنادار نشد ($P=۰/۰۶۰$)؛ همچنین مقادیر ALT در هر سه گروه E ($P<۰/۰۰۱$)، A ($P<۰/۰۰۱$)، EA ($P<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت.*

نتیجه‌گیری: *علی‌رغم عدم ایجاد تأثیر منفی در اثر مصرف AOD9604، اما تمرین استقامتی به تنهایی پاسخ بهتری نسبت به این پپتید نشان داد و به نظر می‌رسد، فرگمنت در کنار تمرین ورزشی می‌تواند در بهبود نشانگان کبد چرب مؤثر واقع شود.*

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، فرگمنت، سیتوکراتین- ۱۸، کبد چرب.

***نویسنده مسئول:** میدان آزادی- پردیس دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده علوم ورزشی، **تلفن:** ۰۵۱۱-۸۸۰۳۴۹۰، **نمابر:** ۰۵۱۱-۸۸۰۳۴۹۰، **Email:** Mfathie@um.ac.ir

ارجاع: دهباشی محسن، فتحی مهرداد، عطارزاده‌حسینی سیدرضا، مسافری ضیاءالدینی محمد. اثر هشت هفته تمرین استقامتی و تزریق قطعه لیپولیتیک هورمون رشد (AOD9604) بر آنزیم‌های کبد و CK18 موش‌های سوری القاء شده به کبد چرب غیرالکلی ناشی از رژیم غذایی پر چرب. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛۱۵(۴):۱۹-۱۲.

www.SID.ir

مقدمه

با افزایش ورود صنایع تصنعی به زندگی افراد و گسترش کم‌تحرکی، ناهنجاری هایی همچون بیماری کبد چرب افزایش‌یافته است، (۱). بیماری کبد چرب غیرالکلی (Non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) به‌عنوان شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی در سراسر جهان شناخته می‌شود، به‌طوری که در سال ۲۰۱۹ عامل ۲۵ درصد از نیاز به پیوند کبد در بیماران را NFLAD عنوان کرده‌اند (۱ و ۲). NAFLD شامل دامنه وسیعی از آسیب‌های کبدی است که از استئاتوز ساده به استئاتوهپاتیت، فیبروز، سیروز و در نهایت سرطان سلول‌های کبدی پیشرفت می‌کند (۳) این اختلال به علت رسوب و تجمع ذرات درشت (Macro Vesicular) چربی در داخل سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها (Hepatocyte) به مقدار بیش از ۵ الی ۱۰ درصد وزن کبد ایجاد می‌شود و آسیب شدید هپاتوسیت‌ها را در طیف وسیعی نشان می‌دهد (۴) بی‌تحرکی و اضافه وزن، افزایش تراوش اسیدهای چرب آزاد از منابع اگزوژن (Exogenous) و آندوژن (Endogenous) (5))، افزایش لیپوژنز مجدد و بی‌نظمی در بتااکسیداسیون و مقاومت به انسولین (۶) همگی می‌توانند رسوب‌گیری چربی در کبد را افزایش دهند (۷) مقاومت به انسولین یکی از مهمترین مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیکی اولیه در ایجاد NAFLD می‌باشد که با تجمع اکتوپیک (Ectopic) چربی در کبد مرتبط بوده باعث افزایش اسیدهای چرب موجود در این ارگان می‌شود (۸). در حال حاضر بسیاری از محققین، نقش مرکزی مقاومت انسولینی را به‌عنوان رویدادی برای تحریک تجمع اسید چرب در سلول‌های کبدی معرفی می‌کنند و آن را به‌عنوان مهمترین مکانیسم پاتوفیزیولوژیکی اولیه در ایجاد بیماری کبد چرب دانسته‌اند، مقاومت به انسولین هجوم اسیدهای چرب در کبد را به نفع لیپوژنز و جلوگیری از لیپولیز چربی‌ها به شدت افزایش باعث وقوع NAFLD می‌شود (۹). ماکسیموس و همکاران اخیراً نشان دادند که افزایش ALT پلاسما عمدتاً به‌دلیل مقاومت به انسولین در بافت چربی و محتوای تری‌گلیسیرید کبد است. بنابراین، بهبود ALT یکی از اهداف درمانی در NAFLD است (۱۰). همچنین مشخص شده است رابطه مستقیم بین سیتوکراتین-۱۸ (Cytokeratin 18 (CK18)) و آنزیم‌های کبد برقرار است (۱۱). CK18 که از آن به‌عنوان یکی از دقیق‌ترین نشانگرهای سرمی در تشخیص بیماران مبتلا به کبد چرب یاد می‌شود، اصلی‌ترین رشته پروتئینی متوسط کبد است که در آسیب هپاتوسیت‌ها، مرگ سلولی و در طی آپوپتوز بر اثر کاسپازها در جریان خون آزاد می‌شود (۱۲) این سیتوکراتین به‌وسیله کاسپازهای ۳ و ۶ در دو سایت (ASP238 و ASP396) در طی آپوپتوز شکسته می‌شوند. قطعات CK18 شکسته شده پایدار هستند و مقاوم به پروتئولیز بوده و در پلاسما و سرم قابل اندازه‌گیری هستند (۱۳).

اثرات NAFLD در بیماران مبتلاء، طیف وسیعی از مشکلات را برای فرد ایجاد می‌کند که از آن جمله می‌توان به اختلال در ترشح GH اشاره نمود (۱۴) در یک مطالعه مقطعی، سطح GH پایین با شیوع NAFLD بالاتر همراه بود (۱۵) GH به‌عنوان یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای با ۱۹۱ آمینو اسید در مواجهه با کاهش چربی‌های احشایی عملکردی دوسویه دارد، چرا که علی‌رغم اینکه دارای اثرات لیپولیتیک و ضدکاتابولیکی است، یک عامل دیابتوژنیک می‌باشد که از طریق مخالفت با عملکرد انسولین باعث عدم تحمل گلوکز و گسترش مقاومت به انسولین می‌شود (۱۶). مشخص شده است ۱۵ اسید آمینه انتهایی GH مسئول تحریک لیپولیز می‌باشد که اولین بار محققان فعال در عرصه فارماکولوژی در دانشگاه موناش استرالیا موفق به استحصال آن شدند، AOD9604 که با نام فرگمنت معرفی شده است، یک پپتید متشکل از قطعه C انتهایی هورمون رشد انسانی است که صرفاً از آمینو اسیدهای ۱۷۷–۱۹۱ هورمون رشد، با یک باقی‌مانده تیروزین اضافی در پایانه N پپتید تشکیل شده است (۱۷). در مدل‌های حیوانی القاء چاقی، AOD9604 باعث کاهش وزن بدن، افزایش لیپولیز و افزایش اکسیداسیون چربی می‌شود و بیان شده است فاقد سایر آثارجانبی هورمون رشد است (۱۸ و ۱۹). مشخص شده است که فعالیت‌های بدنی روش مناسبی برای بهبود وضعیت سلامتی و جلوگیری و درمان بیماری‌های مرتبط با چاقی است. قرقانی و همکاران تأثیر هشت هفته تمرین هوازی بر پاسخ گلوکز و آنزیم‌های کبدی موش‌های القاء شده به NAFLD را مورد بررسی قرار دادند، نتایج آنها بهبود پاسخ گلوکز و آنزیم‌های کبدی را نشان داد (۲۰) بر اساس مطالعات انجام شده تمرین ورزشی باعث بهبود مقاومت به انسولین، افزایش حساسیت گیرنده‌ها به انسولین و به‌طور کلی مصرف بهتر گلوکز و اسیدهای چرب می‌شود که بهبود این عوامل از مسیرهای پاتوژنز اصلی ایجاد NAFLD است (۲۱ و ۲۲). همچنین تمرینات استقامتی باعث افزایش لیپولیز می‌شود (۲۳) همسو با این اثر، فرگمنت نیز بر لیپولیز مؤثر است، نکته حائز اهمیت در مورد این پپتید، ادعای عدم‌تحریک مقاومت به انسولین در اثر استعمال آن است چرا که فاقد سایر زنجیره‌های پپتیدی هورمون رشد بوده، پاسخ لیپولیتیک آن بیشتر از GH است (۱۷) این اثر و افزایش اسیدهای چرب پلاسما با روش‌های مختلف ممکن است بر مسیر انتقال پیام انسولین تأثیر داشته و سبب اختلال در عملکرد مولکول‌های مؤثر در انتقال پیام انسولین شود (۲۴) از طرفی تحقیقی که اثر لیپولیز به تنهایی و بدون فعالیت بدنی بر NALFD را بررسی کرده باشد توسط محقق یافت نشد، لذا در این پژوهش که برای اولین بار انجام می‌شود، محققین

www.SID.ir

درصدد پاسخ به این مسأله هستند که جداسازی قطعه لیپولیتیک هورمون رشد (با/بدون تمرین ورزشی) چه اثراتی بر مقاومت به انسولین و شاخص‌های مرتبط با NAFLD دارد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تحقیقات تجربی می‌باشد. جامعه آماری پژوهش حاضر را موش‌های نر بالغ نژاد سوری تشکیل می‌دادند که از بین آن‌ها تعداد ۴۲ سر موش با میانگین وزن ۳±۲۰ گرم به‌عنوان نمونه پژوهش خریداری شده در شرایط کنترل شده، نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۳±۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. بعد از یک هفته سازگاری با محیط، از این تعداد، ۷ عدد به‌عنوان گروه کنترل (تغذیه طبیعی) انتخاب شدند و سایر نمونه‌ها به مدت ده هفته تحت رژیم غذایی پُرچرب قرار گرفته و القاء به آسیب کبدی شدند. پس از ده هفته تغذیه شدن با رژیم غذای پُرچرب، تعداد ۷ عدد موش به همراه گروه کنترل، برای تأیید ابتلاء، مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه سایر موش‌ها به‌صورت تصادفی به چهار گروه هفت عددی شامل گروه کنترل (C)، تمرین (E)، تمرین + فرگمنت (EA)، فرگمنت بدون تمرین (A) تقسیم شدند و همه گروه‌ها تا انتها تحت رژیم پر چرب قرار گرفتند. نمونه‌های تحت فعالیت ورزشی، طبق جدول ۲، پنج جلسه در هفته برنامه تمرینی داشتند. در پایان مطالعه، پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین توزین انجام شده و 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.لازم به ذکر است کلیه اصول اخلاقی بیانیه هلسینیکی رعایت گردید و پژوهش با شناسه اخلاق IR.UM.REC.1399.070 مصوب گردید.

با توجه به مواد تشکیل‌دهنده غذای استاندارد جوندگان، غذای پرچرب مورد استفاده (جدول ۱) شامل غذای پایه جوندگان که با افزودن ۱۱ درصد چربی حیوانی، ۲ درصد کلسترول (شرکت مرک آلمان)- و ۱ درصد اسید کولیک (شرکت سیگما آمریکا) توسط محقق ساخته شد (۲۵ و ۲۶).

جدول ۱- درصد مواد تشکیل‌دهنده رژیم غذایی استاندارد و پُرچرب

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

براساس جدول ۲، برنامه تمرین هوازی به مدت هشت هفته و با استفاده از دستگاه نوارگردان ویژه جوندگان ساخت کشور ایران صورت پذیرفت. ابتدا تسمه نوارگردان با متر اندازه‌گیری شد و سپس نقطه‌ای از آن به‌عنوان معیار مشخص شد. آنگاه، مدت زمان سپری شده برای یک دور کامل تسمه نوارگردان در فرمول سرعت قرار داده و در نتیجه با مانیتورینگ دستگاه مطابقت داده شد. در ابتدا یک هفته آشنایی با محیط ورزشی در دستور کار قرار گرفت و موش‌ها هر روز۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه برای سازگاری فعالیت نمودند. از ابتدای هفته دوم برنامه تمرین استقامتی متناسب با تحقیقات صورت گرفته و جدول ۱ آغاز گردید در این مدت نمونه‌های گروه کنترل بدون هیچ‌گونه فعالیتی صرفاً با رژیم پرچرب نگه‌داری شدند (۲۷).

جدول ۲- پروتکل تمرین موش‌های سوری در طی هشت هفته

هفته	جلسه	شیب	زمان / سرعت	گرم /سرد کردن	هفته	جلسه	شیب	زمان / سرعت	گرم /سرد کردن
اول	یک دو سه چهار پنج	صفر	۱۵ دقیقه/۱۰ متر بر دقیقه	صفر	دوم الی هشتم	شش الی چهل	۵ درجه	۶۰ دقیقه/۱۵ – ۱۷ متر بر دقیقه	۵ دقیقه/ ده متر در دقیقه

پروتکل تزریق شامل روزانه تزریق قطعه لیپولیتیک (AOD9604) (ساخت کمپانی Auspep کشور استرالیا) ۲۵۰ پیکوگرم به ازای هر کیلو از وزن بدن موش‌ها در نظر گرفته شد که به‌صورت درون صفاقی تزریق گردید (۱۹).

به‌منظور اجتناب از تفسیر اشتباه داده‌ها، نمونه‌ها ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و پس از ناشتایی شبانه با ترکیبی از داروی زایلازین (۸ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به‌صورت تزریق درون صفاقی بیهوش شدند. سپس نمونه‌های خون مستقیم از قلب حیوان به میزان ۲±۱/۱سی‌سی گرفته شده پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰، سرم آنها جدا و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- فریز شد.

سطوح آنزیم‌های AST و ALT و گلوکز با استفاده از کیت اندازه‌گیری شرکت پارس آزمون و به‌وسیله روش کالریمتریک توسط دستگاه اتوآنالایزر (هیتاچی ۹۱۲ ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد، همچنین جهت اندازه‌گیری مقادیر انسولین و CK18 (کیت Biological Assays ساخت کشور چین) از روش الایزا استفاده شد. برای ارزیابی مقاومت به انسولین از روش مدل ارزیابی (HOMA-IR) طبق فرمول زیر استفاده شد (۲۸).

www.SID.ir

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{گلوکز ناشتا(میلی مول بر لیتر)} \times \text{انسولین ناشتا(میکرو واحد بر لیتر)}}{22/5}$$

پس از جمع‌آوری و وارد کردن داده‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS برای محاسبه شاخص‌های گرایش مرکزی، پراکندگی از آمار توصیفی و برای کسب اطمینان از نرمال‌بودن توزیع نظری داده‌ها از آزمون آماری شاپیرووِیلک استفاده گردید. همچنین تعیین تفاوت میانگین‌های بین گروهی با آزمون آماری تحلیل واریانس (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی شد بررسی شد. آزمون فرضیه‌ها کمتر از ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

براساس جدول ۳ و پس از هشت هفته انجام پروتکل، نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها و آزمون توکی نشان داد که تغییرات بین گروهی شاخص HOMA-IR در دو گروه E (P=۰/۰۰) و EA (P=۰/۰۳) نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت، HOMA-IR در گروه A علیرغم کاهش نسبی معنادار نبود (P=۰/۱۵). CK18 در مقایسه با گروه کنترل فقط در گروه E کاهش معنادار نشان داد (P<۰/۰۰۱). تغییرات AST در مقایسه بین گروه‌ها و با مقایسه گروه کنترل علی‌رغم کاهش نسبی در گروه A در هیچ یک از گروه‌ها معنادار نشد (P=۰/۰۶۰). همچنین مقادیر ALT در هر سه گروه E (P<۰/۰۰۱)، EA (P<۰/۰۰۱)، A (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل معنادار کاهش داشت.

جدول ۳- نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه بین گروهی

متغیر	گروه	میانگین/انحراف استاندارد	مقادیر F	سطح معناداری
سیتوکراتین-۱۸ (M30)(pg/ml)				
	کنترل	۱۸۲/۷۱±۲۴	۸/۱۸	*<۰/۰۰۱
	E	۱۴۸/۵۷±۷		
	EA	۱۶۳/۲۸±۱۲		
	A	۱۷۱/۱۳±۱۴		
آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) (Iu/I)				
	کنترل	۱۹۸/۰±۴۱	۲/۹۲	۰/۶۰
	E	۱۹۲/۷±۵۷		
	EA	۱۶۱±۲۳		
	A	۱۶۰±۳۸		
آلانین آمینوترانسفراز (ALT) (Iu/I)				
	کنترل	۳۰۸±۸۶	۱۳/۷	*<۰/۰۰۱
	E	۱۵۸±۳۱		
	EA	۱۳۸±۳۳		
	A	۱۵۰/۲±۴۳		
HOMA-IR				
	کنترل	۵۷±۵	۱۹/۶	*<۰/۰۰۱
	E	۴۱±۶		
	EA	۴۷±۵		
	A	۵۳±۸		

*: اختلاف معنادار در سطح P<۰/۰۵

بحث

مقاومت به انسولین و چاقی دو عنصر مهم در پاتوژنز NAFLD می‌باشند که هر دو جریان اسیدهای چرب آزاد از چربی زیر پوستی و احشایی به کبد را افزایش داده و سنتز درون کبدی چربی‌ها را بالا می‌برند، از جمله نتایج تحقیق حاضر کاهش مقادیر HOMA-IR در دو گروه E و EA بود، که با تحقیقات چانگ و همکاران (۲۰۲۰) لامبرت و همکاران (۲۹) همسو می‌باشد، در مطالعه چانگ که بر روی موش‌های نر نژاد C57BL6 صورت پذیرفت تأثیر دوازده هفته تمرین ورزشی مورد سنجش قرار گرفت، در این پژوهش موش‌ها به دو گروه کنترل و رژیم غذایی پرچرب تقسیم شدند و هر هفته پنج جلسه تمرین استقامتی انجام دادند، نتایج آنها نشان داد تمرین ورزشی باعث کاهش حساسیت به انسولین و افزایش عملکرد سلول‌های بتای پانکراس می‌شود (۳۰).

افزایش نقص در متابولیسم گلوکز و مقاومت به انسولین به‌عنوان یکی از اساسی‌ترین پیش‌زمینه‌های ایجاد کبد چرب غیرالکلی با پیشرفت بیماری و ایجاد فیبروز در ارتباط است و اصلاح این شرایط بخشی اساسی در درمان NFALD است (۳۱). به‌طور کلی مسیر پیام‌رسانی انسولین در دو مسیر اصلی متابولیک و غیرمتابولیک قابل بررسی است. در مسیر غیر متابولیک واسطه‌هایی فعال شده که در نهایت وارد هسته می‌شوند و باعث

www.SID.ir

بیان بعضی از ژن‌ها می‌گردند. اما مسیر متابولیک از یک طرف باعث فعال شدن مسیر ذخیره‌ای مثل لیپوژنز و گلیکوژنز شده و از طرف دیگر باعث قرارگیری ناقل غشایی گلوکز در غشا می‌گردد. بدین ترتیب باعث ورود گلوکز به سلول‌های هدف انسولین و ذخیره شدن در سلول می‌شود. فعالیت ورزشی موجب افزایش عملکرد انسولین از طریق کاهش تجمع تری‌گلیسرید درون سلولی و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌گردد (۳۲) مکانیزم‌های دیگری نیز می‌توانند سبب افزایش عمل انسولین بعد از انجام تمرینات هوازی شوند که عبارتند از: افزایش پیام‌رسانی پیش‌گیرندهای انسولین، افزایش پروتئین انتقال‌دهنده گلوکز GLUT4 افزایش فعالیت گلیکوژن سنتتاز و هگزوکیناز، کاهش رهایش و افزایش پاک شدن اسیدهای چرب آزاد، افزایش رهایی گلوکز از خون به عضله به علت افزایش مویرگ‌های عضله و تغییرات در ترکیب عضله در جهت افزایش برداشت گلوکز (۳۳).

درخصوص نتایج کسب شده در گروه EA، هیچ تحقیقی که تأثیر فرگمنت بر مقاومت به انسولین را با و بدون تمرین ورزشی سنجیده باشد یافت نشد اما می‌توان کاهش مقاومت به انسولین در این گروه را به اثرات تمرین منتسب نمود، چرا که در گروه A هیچ‌گونه تغییر معنادار مثبت یا منفی در شاخص مقاومت به انسولین دیده نشد (۲۴) از این‌رو یکی از ابهاماتی که در این پژوهش به آن پاسخ داده شد عدم‌گسترش مقاومت به انسولین ناشی از تزریق فرگمنت بود.

کاهش مقادیر CK18 در گروه E و EA همسو با تحقیقات تاکاهاشی و همکاران و فیلی و همکاران از دیگر نتایج این تحقیق بود، در تحقیق تاکاهشی پنجاه بیمار مبتلابه NAFLD برای یک دوره آزمایشی ۱۲ هفته‌ای در قالب دو گروه تمرین مقاومتی و کنترل تقسیم شدند. در طول مطالعه، گروه تمرین هفته‌ای سه بار در روزهای غیرمتوالی مبادرت به انجام فعالیت نمودند، نتایج آنها نشان داد سطح سرمی قطعات CK18 و FGF21(Fibroblast Growth Factor 21) در اثر تمرین ورزشی در این افراد کاهش یافت (۳۴). در تحقیق فیلی اثر هفت روز تمرین دویدن بر CK18 در ۱۳ فرد دارای اضافه وزن مبتلابه NAFLD مورد ارزیابی قرار گرفت، آنها عنوان کردند که ۶۰ دقیقه تمرین هوازی کوتاه مدت در محدوده ۸۰ درصد حداکثر ضربان قلب بیشینه CK18 را کاهش می‌دهد (۳۴). در توجیه این نتیجه نشان داده شده است که شاخص‌های آپوپتوز هپاتوسیت در اثر تمرینات ورزشی از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن و افزایش حساسیت به انسولین کاهش می‌یابد، لذا تمرین ورزشی یک محرک ضدآپوپتوزی را ایجاد می‌کند که منجر به کاهش قطعات CK18 می‌شود (۳۵). به‌علاوه این امر می‌تواند توسط کاهش در مسیر پیامدهی FAS1 تعدیل شده باشد، FAS به‌عنوان یک پروتئین گلیکوزیله که در کبد بیان می‌شود، توسط اتصال لیگاند FAS فعال شده و منجر به کمپلکس مرگ سلول‌های کبدی (آپوپتوز) می‌شود و بیان FAS در بیماران مبتلا به کبد چرب افزایش می‌یابد (۳). تغییرات بین‌گروهی CK18 در دو گروه A و EA معنادار نبود، تحقیقی که اثر تمرین و تزریق فرگمنت بر CK18 را بررسی کرده باشد یافت نشد اما می‌توان با استناد به رابطه مثبت گسترش مقاومت به انسولین و آپوپتوزیس این مسأله را یکی از دلایل عدم‌تغییر CK18 در این گروه‌ها دانست چرا که در گروه A شاخص HOMA-IR تغییر مثبت معنادار از خود نشان نداده احتمالاً افزایش FFA ناشی از بیش تحریکی لیپولیز در این گروه باعث ایجاد شرایط دیس لیپیدمی شده باشد، که برای بیان قطعیت در این خصوص نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد.

درخصوص آنزیم‌های کبدی کاهش ALT در گروه های مداخله نسبت به گروه کنترل مشاهد شد در حالی که تغییرات AST معنادار نبود، درخصوص ALT نتایج ما با برخی تحقیقات از جمله تاکاهاشی و همکاران، فرزانگی و همکاران هم‌سو بود، در مطالعه تاکاهشی 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 TG در گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل کاهش داشت، در حالی که این تغییرات در گروه تمرین مقاومتی معنادار نشد (۳۶)، کاهش معنی‌دار آنزیم ALTدر اثر تمرین ورزشی را می‌توان به افزایش اکسیداسیون کبدی،کاهش فعالیت و مهار آنزیم‌های لیپوژنیک، افزایش حساسیت به انسولین بافت و کبد و در نتیجه کاهش چربی کبد نسبت داد (۳۷) همچنین فعالیت ورزشی از کبد در مقابل استرس اکسیداتیو و استرس رتیکولوم آندوپلاسمی (ER) محافظت می‌کند (۳۸) و اتوفاژی را بهبود می‌بخشد (۳۹)، که همگی مکانیسم‌های نماینده آسیب کبدی سلول در NAFLD هستند در توجیه اثر کاهش ALT در گروه A، فرگمنت بیان‌گیرنده β3-AR(Beta-3 adrenergic receptors) را در جوندگان افزایش می‌دهد که افزایش متابولیسم چربی را سبب می‌شود (۱۹) همچنین لیپولیز را از طریق فعال‌سازی لیپاز حساس به هورمون، در بافت چربی احشایی تحریک کرده، منجر به حرکت اسید چرب آزاد (FFA) به گردش خون می‌شود (۲۴) وانگ و همکاران گزارش کرده‌اند افزایش تحریک‌گیرنده‌های β3-AR باعث کاهش آنزیم‌های کبد و تری‌گلیسیرید موش‌های القاء شده به کبد چرب می‌شود (۴۰) و نیز این عامل می‌تواند توجیهی بر کاهش نسبی AST و کاهش معنادار ALT در گروه A باشد، با این حال عدم تغییرات معنادار AST در گروه‌های ما، با تحقیقات فرزانگی و همکاران (۴۱) هوبر و همکاران (۴۲) در مغایرت بود، در توجیه این نتیجه می‌توان به تفاوت های مداخله در تحقیقات ما با سایر تحقیقات

www.SID.ir

ناهمخوان اشاره نمود، از طرفی انتشار AST از اندام‌هایی چون قلب و عضله باعث می‌شود ALT را اختصاصی‌تر از AST برای کبد در نظر بگیریم (۶)، لذا عواملی چون تفاوت در رژیم غذایی نمونه‌ها، تأثیر تمرینات ورزشی و همچنین اثرات القاء کبد چرب به همراه تزریق پپتید فرگمنت ممکن است بر سایر اندام‌های آزادکننده این آنزیم مؤثر باشد.

در یک جمع‌بندی کلی نتایج تحقیق ما بیانگر این مطلب است که تمرین ورزشی به تنهایی پاسخ بزرگ‌تری در بهبود نشانگرهای NAFLD نسبت به فرگمنت ایجاد کرده، تلفیق تمرین و فرگمنت ممکن است تأثیر مثبتی بر نشانگان کبد چرب داشته باشد، همچنین ما دریافتیم که فرگمنت ایجاد مقاومت به انسولین نمی‌کند و احتمالاً نقش مقاومت به انسولین در آپوپتوز بیش از احیای مسیرهای اکسیداسیون چربی کبدی باشد. در مجموع با توجه به اینکه مطالعات غیرکلینیکی متعدد هیچ‌گونه شواهدی از نگرانی‌های ژنوتوکسیک یا سم‌شناسی در مورد ایمنی AOD9604 نشان نداده‌اند (۴۳ و ۴۴) ممکن است AOD9604 اثرات بیولوژیکی مثبتی در انسان داشته باشد که برای اثبات قطعی نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آوریم.

References

1. 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;18:690-5. doi:10.1038/oby.2009.316
2. Iqbal U, Perumpail BJ, Akhtar D, Kim D, Ahmed A. The epidemiology, risk profiling and diagnostic challenges of nonalcoholic fatty liver disease. Medicines 2019;6:41. doi:10.3390/medicines6010041
3. Rajabi S, Askari R, Haghighi AH, Razaviyanzadeh N. Effect of resistance-interval training with two different intensities on cytokeratin18 and some functional parameters in women with fatty liver. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility 2020;23:68-81.
4. Pi H, Liu M, Xi Y, Chen M, Tian L, Xie J, et al. Long-term exercise prevents hepatic steatosis: a novel role of FABP1 in regulation of autophagy-lysosomal machinery. The FASEB Journal 2019;33:11870-83. doi:10.1096/fj.201900812R
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;50:1844-50. doi: 10.2337/diabetes.50.8.1844
6. Reddy JK, Sambasiva Rao M. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 2006;290:G852-G8. doi: 10.1152/ajpgi.00521.2005
7. Goessling W, Friedman LS. Increased liver chemistry in an asymptomatic patient. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2005;3:852-8. doi: 10.1016/s1542-3565(05)00416-7
8. 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;1821:809-18. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.10.016
9. Moosavi-Sohroforouzani A, Ganbarzadeh M. Reviewing the physiological effects of aerobic and resistance training on insulin resistance and some biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease. KAUMS Journal (FEYZ) 2016;20:282-96.
10. 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;101:644-52. doi: 10.1210/jc.2015-3111
11. Tsutsui M, Tanaka N, Kawakubo M, Sheena Y, Horiuchi A, Komatsu M, et al. Serum fragmented cytokeratin 18 levels reflect the histologic activity score of nonalcoholic fatty liver disease more accurately than serum alanine aminotransferase levels. Journal of clinical gastroenterology 2010;44:440-7. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181bdefe2
12. Festi D, Schiumerini R, Marzi L, Di Biase A, Mandolesi D, Montrone L, et al. the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease–availability and accuracy of non-invasive methods. Alimentary pharmacology & therapeutics 2013;37:392-400. doi: 10.1111/apt.12186
13. 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;50:1072-8. doi: 10.1002/hep.23050
14. Takahashi Y, Iida K, Takahashi K, Yoshioka S, Fukuoka H, Takeno R, et al. Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency. Gastroenterology 2007;132:938-43. doi: 10.1053/j.gastro.2006.12.024
15. Rufinatscha K, Ress 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;12:474-81. doi: 10.1007/s12072-018-9893-7
16. Randle P, Garland P, Hales C, Newsholme E. The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. The Lancet 1963;281:785-9. doi: 10.1016/S0140-6736(63)91500-9
17. Stier H, Vos E, Kenley D. Safety and Tolerability of the Hexadecapeptide AOD9604 in Humans. Journal of Endocrinology and Metabolism 2013;3:7-15. doi: 10.14740/jem213w
18. Ng F, Sun J, Sharma L, Libinaka R, Jiang W, Gianello R. Metabolic studies of a synthetic lipolytic domain (AOD9604) of human growth hormone. Hormone Research in Paediatrics 2000;53:274-8. doi: 10.1159/000053183
19. Heffernan M, Summers RJ, Thorburn A, Ogru E, Gianello R, Jiang W-J, et al. The Effects of Human GH and Its Lipolytic Fragment (AOD9604) on Lipid Metabolism Following Chronic Treatment in Obese Mice andβ 3-AR Knock-Out Mice. Endocrinology 2001;142:5182-9. doi: 10.1210/endo.142.12.8522
20. 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. Obesity research & clinical practice 2018;12:80-9. doi: 10.1016/j.orcp.2017.01.004
21. 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;16:37. doi: 10.1186/s12933-017-0518-6
22. Irving BA SK, Sreekumaran Nair K, Stump CS. Nine Days of Intensive Exercise Training Improves Mitochondrial Function But Not Insulin Action in Adult Offspring of Mothers with Type 2 Diabetes. Clin Endocrinol Metab 2011;96:1137-41. doi: 10.1210/jcem.96.9.zeg2936b

www.SID.ir

23. Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. Journal of gastroenterology and hepatology 2013;28:59-63. doi: 10.1111/jgh.12407

24. Kim S-H, Park M-J. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human. Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism 2017;22:145. doi: 10.6065/apem.2017.22.3.145

25. 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. Journal of Babol University Of Medical Sciences 2016;18:57-62.

26. 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;7:1-14. doi: 10.1038/s41598-017-05040-6

27. 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. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2013;15:311-21. doi: 10.1038/s41598-017-05040-6

28. Sâmpelean D, Hănescu B, Han A, Adam M, Casoinic F. The prognosis of glycoregulation disturbances and insulin secretion in alcoholic and C virus liver cirrhosis. Romanian journal of internal medicine= Revue roumaine de medecine interne 2009;47:387-92. doi: 10.1038/s41598-18=65287

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;8:1-10. doi: 10.1038/s41598-018-21287-z

30. Chang G-R, Hou P-H, Chen W-K, Lin C-T, Tsai H-P, Mao FC. Exercise Affects Blood Glucose Levels and Tissue Chromium Distribution in High-Fat Diet-Fed C57BL6 Mice. Molecules 2020;25:1658. doi: 10.3390/molecules25071658

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. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 2018;13:1-10.

32. Baharloo S, Taghiyan F, Hedayati M. Effect of aerobic exercise on glucose, insulin and insulin resistance in subclinical hypothyroidism overweight-obese women. Razi Journal of Medical Sciences 2014;21:75-84. doi: 10.1038/jr.2014.125

33. 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;16:37. doi: 10.1186/s12933-017-0518-6

34. 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 2012;113:1-6. doi: 10.1152/japplphysiol.00127.2012

35. Takahashi A, Abe K, Fujita M, Hayashi M, Okai K, Ohira H. Simple resistance exercise decreases cytokeratin 18 and fibroblast growth factor 21 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A retrospective clinical study. Medicine 2020;99:e20399. doi:10.1097/md.0000000000020399

36. 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:E2. doi: 10.1055/0042-117875

37. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. Frontline gastroenterology 2014;5:211-8. doi: 10.1136/flgastro-2013-100403

38. 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;111:2015-23. doi: 10.1007/s00421-010-1802-2

39. Rosa-Caldwell ME, Lee DE, Brown JL, Brown LA, Perry Jr RA, Greene ES, et al. Moderate physical activity promotes basal hepatic autophagy in diet-induced obese mice. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism 2017;42:148-56. doi: 10.1139/apnm-2016-0280

40. Wang Z, Li S, Wang R, Guo L, Xu D, Zhang T, et al. The protective effects of the β3 adrenergic receptor agonist BRL37344 against liver steatosis and inflammation in a rat model of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Molecular Medicine 2020;26:1-14. doi: 10.1186/s10020-020-00164-4

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.European journal of sport science 2019;19:994-1003. doi: 10.1080/17461391.2019.1571114

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;50:930-9. doi: 10.1111/apt.15427

43. Cox HD, Smeal SJ, Hughes CM, Cox JE, Eichner D. Detection and in vitro metabolism of AOD9604. Drug Testing and Analysis 2015;7:31-8. doi: 10.1002/dta.1715

44. Moré MI, Kenley D. Safety and Metabolism of AOD9604, a Novel Nutraceutical Ingredient for Improved Metabolic Health. Journal of Endocrinology and Metabolism 2014;4:64-77. doi:10.14740/jem213w

www.SID.ir

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2021; Vol 15, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v4i15.2476

Original Article

The Effect of Eight Weeks of Endurance Training and Injection of Growth Hormone Lipolytic Fragment (AOD9604) on CK18 and Liver Enzymes of NAFLD-Induced Mice Induced by High-Fat Diet

Mohsen Dehbashi (Ph.D. Student)[1], Mehrdad Fathie (Ph.D.)[2*], Seyyed Reza Attarzadeh Hosseini (Ph.D.)[2], Mohammad Mosaferi Ziaaldini(Ph.D.)[2]

1- Ph.D. Student of Exercise Biochemistry and Metabolism, School of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- School of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 30 November 2020**, Accepted:** 20 February 2021

Abstract:

Introduction: *Fatty liver is on the rise in the world, so the aim of this study was to investigate The effect of eight weeks of endurance training, injection of growth hormone lipolytic fragment (AOD9604) on CK18 and liver enzymes of NAFLD on mice induced mice induced by high-fat diet.*

Methods: *In This experimental study, 28 male mice were, divided into four groups(n=7): control (C), Exercise (E), Exercise + Fragment (EA), Fragment without training (A) group. The Medium intensity endurance training program was performed for eight weeks and 5 sessions per week. The Fragment injection protocol was considered to be 250 picograms per kilogram of body weight per day. Samples were evaluated 48 hours after the last training session . Statistical analysis of the data using the software SPSS version 26, using OneWay ANOVA and post hoc Tukey tests at the significant level (P<0/05) was carried out.*

Results: *CK18 showed a significant decrease compared to the control group only in group E(P=0.00). HOMA-IR index had a significant decrease in E (P=0.00) and EA (P=0.03) groups, but no significant changes in A group. Changes in AST were not significant in any of the groups. ALT levels in all three groups of E (P=0.00), A(P=0.00) and EA(P=0.00) were significantly lower than the control group.*

Conclusion: *Despite not having a negative effect on AOD9604, endurance training alone showed a better response to this peptide. It seems that fragmentation along with exercise can be effective in improving fatty liver syndrome.*

Keywords: Endurance training, Fragment, Cytokeratin-18, Fatty Liver.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** M. Fathie, **Email**: mfathie@um.ac.ir*

Citation: Dehbashi M, Fathie M, Attarzadeh Hosseini SR, Mosaferi Ziaaldini M. The effect of eight weeks of endurance training and injection of growth hormone lipolytic fragment (aod9604) on ck18 and liver enzymes of nafld-induced mice induced by high-fat diet. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2021;15(4):12-19.

www.SID.ir