

ORIGINAL RESEARCH PAPER

## Investigating the Effect of 8 Weeks of Endurance Training on the Levels of Inflammatory Markers (IL-6/TNF- $\alpha$ ) and Some Metabolic Parameters in Male Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Vahid Kazemizadeh<sup>1</sup>, Amirabbas Monazzami<sup>1\*</sup>, Fakhredin Saba<sup>2</sup>, Andrew J McAinch<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran.

<sup>2</sup>Department of Medical Laboratory Science, School of Paramedical, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

<sup>3</sup>Institute for Health and Sport, Victoria University, Melbourne, Australia.

Received: 11-7-2024

Accepted: 30-11-2024

### ABSTRACT

**Introduction:** This study aimed to analyze the effects of endurance training (Aerobic) on the levels of inflammatory markers (IL-6/TNF- $\alpha$ ) and some metabolic parameters in male rats with non-alcoholic fatty liver disease to investigate the feasibility of using exercise training to reduce inflammation.

**Material and Methods:** A total of 44 Wistar rats were randomly assigned into two groups: (I) standard diet group of 22 rats and (II) high-fat diet group with 22 rats supplemented with free access to fructose water. After 17 weeks, two rats from each group were sacrificed, and liver tissue was collected for hematoxylin-eosin staining. Subsequently, the remaining 20 rats in the (I) group were divided into a training group (T) and a control group (C). The 20 rats in the (II) group supplemented with fructose water were divided into a fatty liver group (FL) and a fatty liver + training group (FL+T), each comprising ten rats. In the next phase, the T-groups underwent an eight-week endurance training intervention. Then, IL-6, TNF- $\alpha$ , glucose, insulin, insulin resistance and sensitivity levels were measured.

**Results:** The results of the present study showed that as a result of a high-fat diet with liquid fructose in HFD+HF group rats, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) with complications such as a significant increase in the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$ , Hepatic dysfunction, and metabolic parameters were disturbed ( $p < 0.001$ ). However, endurance training improved most of these complications by reversing the disease process ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** According to the results of the present study, it can be concluded that the improvement of inflammatory markers, liver dysfunction, and metabolic parameters through endurance training is one of the key mechanisms of exercise in the treatment of NAFLD, the consequences of which may show the importance of endurance training in treatment of NAFLD highlights.

**Keywords:** Nonalcoholic fatty liver disease, Metabolic syndrome, Aerobic exercise, Inflammatory markers, IL-6, TNF- $\alpha$ , Insulin resistance and sensitivity

### HOW TO CITE THIS ARTICLE

Kazemizadeh V, Monazzami AA, Saba F, McAinch AJ. Investigating the Effect of 8 Weeks of Endurance Training on the Levels of Inflammatory Markers (IL-6/TNF- $\alpha$ ) and Some Metabolic Parameters in Male Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Health Saf Work*. 2024; 14(4): 841-856.

## 1. INTRODUCTION

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the most prevalent chronic liver disease and has gained momentum across society due to increased instances of obesity. The global prevalence of

NAFLD among adults is reported at 32 percent and more common among men (40%) than women (26%). The global prevalence of the disease has increased over time, with 26% reported in the studies conducted in 2005 increasing to 38% in the studies conducted in 2016 and later. Studies report

\* Corresponding Author Email: [monazzami.amirabbas@gmail.com](mailto:monazzami.amirabbas@gmail.com)

the prevalence of NAFLD in Iran at 40.08%, which is above the global average. As fatty liver disease implies the involvement of the liver in insulin resistance disorder (i.e., the metabolic syndrome), its consequence is represented by an increase in death rates due to cardiovascular complications. In other words, it appears that the majority of patients with fatty liver disease die due to the cardiovascular symptoms of the metabolic disease, long before the emergence of cirrhosis.

The systemic inflammatory response syndrome plays a remarkable role in fatty liver disease, and cytokines secreted by the liver, adipose, and muscular tissues are key to insulin resistance. Moreover, there is a correlation between obesity, insulin resistance, and adipokines and cytokines involved in the metabolism of fats and carbohydrates. Studies conducted so far have shown that inflammatory cytokines like the tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) are more highlighted among obese populations and relevant diseases compared to people with normal weights. The significant production of inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$  and IL-6 is a key factor in the development of insulin resistance, fatty liver disease, diabetes, and metabolic syndrome. On the other hand, TNF- $\alpha$  disrupts the signaling path of insulin, including the phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) in pathological conditions like chronic inflammation and the emergence of acute-phase reactions with the increased survival of inflammatory signals and the stimulation of cell death.

The primary line of therapy for NAFLD is weight loss by calorie restriction or physical exercise, which are utilized to control the condition. Although various clinical studies have been undertaken to assess the efficacy of exercise training in treating NAFLD, there is no consistent result due to the variety of exercise

protocols, diagnostic indicators, and sample sizes, as some exercise types may lead to exercise injuries, and choosing the appropriate exercise for the patient is essential. This is while more research is still needed to optimize the intensity and exercise load. On the other hand, treating NAFLD with medicines is typically expensive, intrusive, and associated with side effects; therefore, preventing and treating NAFLD necessitates a collaborative intervention to provide a more significant therapeutic result than a single intervention. The study examined how eight weeks of endurance training on the levels of inflammatory markers, insulin resistance, and sensitivity in male rats with non-alcoholic fatty liver disease. Endurance training is expected to help decrease NAFLD by addressing its underlying causes.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Experimental Animals and Endurance training Protocol

A total of 44 early-weaned male Wistar rats were purchased from the Kermanshah University of Medical Sciences and transferred to the animal laboratory. In the following phase, 22 rats were randomly assigned to the regular diet group and 22 to the high-fat diet group, including 60% fat and 25% fructose water with free access. After 17 weeks, two rats from each group were sacrificed, and liver tissue was collected for Hematoxylin-Eosin analysis to establish the absence of alcoholic fatty liver disease. The remaining 20 rats in the standard diet group were divided into two groups: control (C), endurance training (T), and 20 rats in the high-fat diet group, along with 25% fructose water, were divided into two groups: fatty liver (FL) and fatty liver + endurance training (FL+T) (each group containing ten rats). According to Rodrigues et al. , the T-groups completed an 8-week exercise intervention (Figure 1). It should be mentioned

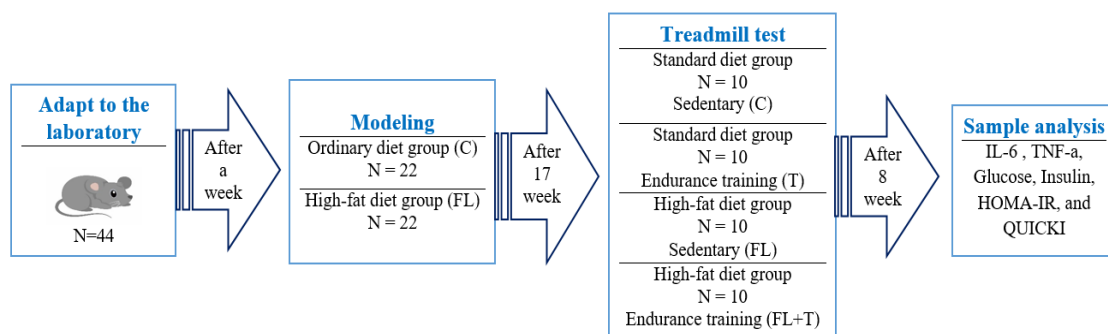


Fig. 1: The experimental design of the study.

Table 1: Animal Feeds Characteristics

Variable (%)	Regular	HFD 60%
<b>Protein</b>	23	24
<b>Carbohydrate</b>	50/3	26
<b>Fat</b>	5/1	35
<b>Fat (c)</b>	-	60
<b>Calories (c/g)</b>	3/1	5/2

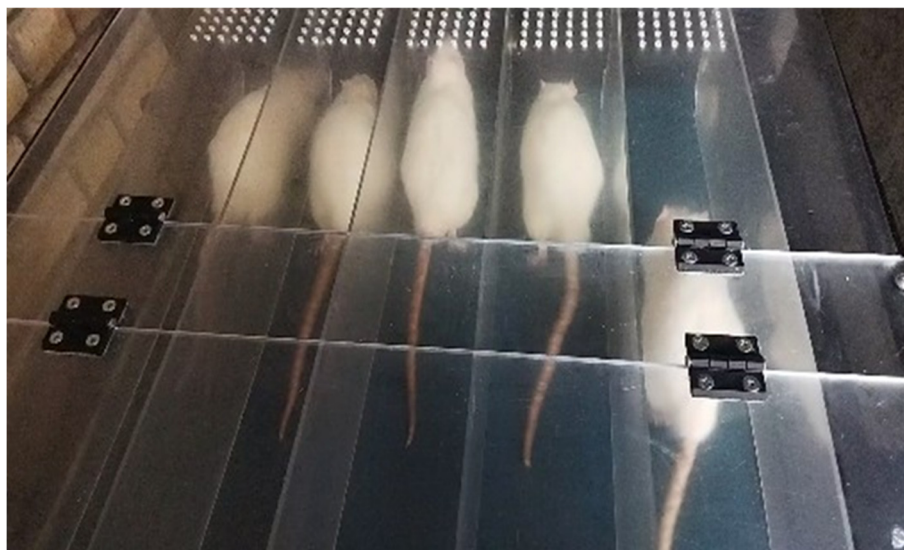


Fig. 2: Carrying out endurance training of the studied rats on a treadmill.

that the regular and high-fat diet groups received 25% fructose water until the completion of the trial (Table 1).

### 2.2. Method of Blood Analysis

Following the application of the independent variable, all samples were collected under completely similar conditions and baseline conditions (48 hours after the last exercise session and 12 hours of fasting to eliminate the acute exercise effects) via intraperitoneal injection of a combination of xylazine (5 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg). A blood sample for measuring IL-6, TNF- $\alpha$  levels, liver enzymes, lipid profile, insulin, and glucose were centrifuged at three thousand revolutions per minute to analyze blood variables. After separating, the serum was stored at -80 degrees Celsius. Then, based on the results obtained from the blood insulin and glucose values, the samples' insulin resistance (HOMA-IR) and insulin sensitivity (QUICKI) were quantified using the standard formula.

### 2.3. Statistical Analysis

The Shapiro-Wilk test was utilized to examine the data's normal distribution. The one-way analysis of variance statistical method and Tukey's post hoc test were considered at a significance level of  $p \leq 0.05$  to reject or accept hypotheses, while the paired t-test was utilized to evaluate differences between two groups.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The inflammatory markers analysis results showed that the IL-6 and TNF- $\alpha$  in the serum of the FL group were notably higher than those of the other groups ( $p < 0.001$ ). Also, the difference was significant between the exercise and sedentary groups ( $p < 0.001$ ). These findings demonstrate that increased inflammation in mice with NAFLD is evident, and endurance exercise can improve the imbalance of serum inflammatory markers (Table 3). In addition to other findings of the present study, it was evident that FL group rats exhibited reduced



Fig. 3: Blood and liver tissue sampling of the studied rats.

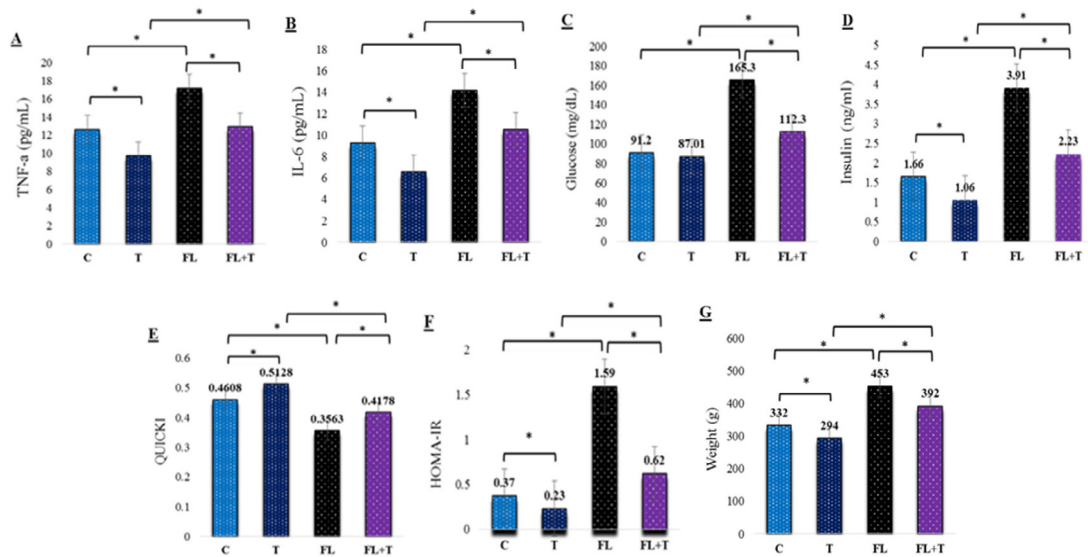


Fig. 4: Investigation of inflammatory markers and metabolic parameters in male rats with nonalcoholic fatty liver disease in the study groups: control group (C), endurance training group (T), nonalcoholic fatty liver group (FL), and nonalcoholic fatty liver group with endurance training (FL+T). Data are presented as means $\pm$ standard deviations. A: Comparison chart of TNF- $\alpha$  index, B: Comparison chart of IL-6 index, C: Comparison chart of glucose index, D: Comparison chart of insulin index, E: Comparison chart of insulin sensitivity index, F: Comparison chart of insulin resistance index, G: Comparison chart of body weight index. Control group (C), Endurance training group (T), Non-alcoholic fatty liver group (FL), and non-alcoholic fatty liver group with endurance training (FL+T). \*; Significant difference at P<0.001 level.

glucose tolerance and insulin sensitivity compared to rats in the C, T, and FL+T groups. In contrast, the T and FL+T groups demonstrated improved glucose tolerance and insulin sensitivity compared to FL mice, with this difference being statistically significant ( $p < 0.001$ ); furthermore, the results from the analysis of serum insulin levels and the insulin resistance index (HOMA-IR) indicated that insulin levels and HOMA-IR were significantly elevated in FL group rats. At the same time, these values were notably lower in the C, T, and FL+T groups

( $p < 0.001$ ). These data underline that endurance exercise can promote glucose tolerance, insulin levels, resistance, and sensitivity (Figure 4).

The analysis of histopathologic changes in the liver showed that feeding a high-fat diet increased lipid (macrovesicular steatosis) in the liver. In the trained groups (T and FL+T groups), training led to the improvement of lipid indices as well as the reduction of hepatic steatosis seen in the FL+T group. In addition, the size of liver fat droplets, as well as their shape (change from macrovesicular

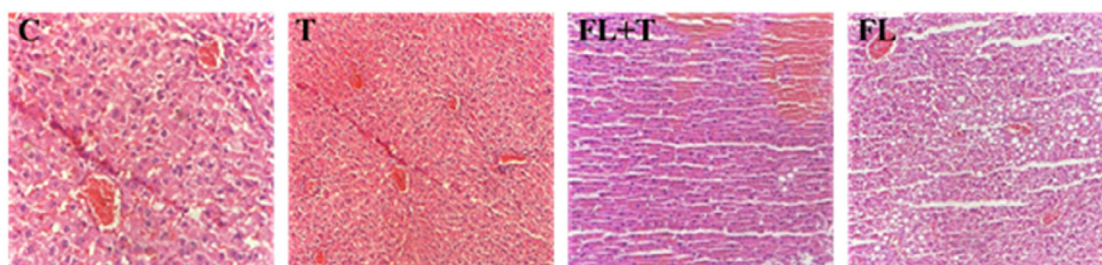


Fig. 5: Investigation of histopathological changes in liver tissue in the study groups: control group (C), endurance training group (T), non-alcoholic fatty liver group (FL), and non-alcoholic fatty liver group with endurance training (FL+T).

to microvesicular shape), in the FL+T group compared to the FL group improved significantly. In addition, HE staining of rat liver tissue showed that rats fed a HFD with fructose for 17 weeks showed a typical appearance of fatty acid infiltration in the liver, indicating that fat metabolism was disrupted, and endurance training effectively alleviated these pathological characteristics. The lipid droplets in the FL+T group were smaller and lower in content, indicating that lipid deposition in the liver was alleviated (Figure 5).

#### 4. CONCLUSIONS

This research examined the impact of endurance exercises on the clinical indicators of liver tissue in male rats in the NAFLD model. The results of the present study showed that endurance exercises can improve the onset of NAFLD by reversing its causative factors; however, only an exercise intervention coupled with a lifestyle change can reverse NAFLD. The study presented here examines the underlying mechanism of how endurance exercises affect NAFLD by investigating the impact of the IL-6/TNF- $\alpha$  /IRS axis on NAFLD pathogenesis in the liver.

Metabolic, endocrine pathways, and cardiorespiratory targeted by chronic endurance exercises have been extensively identified in the literature. Exercise positively modifies the genetic characteristics of the mouse liver by reducing pathways related to insulin resistance, steatosis, fibrosis, and inflammation, suggesting a therapeutic approach for liver diseases. It has also been demonstrated that exercise interventions in humans and animals combat various stages of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) development. This research used a non-stress endurance exercise protocol that improves the spectrum of liver injuries in NAFLD. The present study exercise protocol allowed rats to exercise for long periods with a

controlled approach. The gradual increase in speed and intensity of exercise allows the animal to adapt without any undesirable stimuli, such as electric shock. This research identified the reduction in the IL-6/TNF- $\alpha$  /IRS and structural improvement resulting from endurance exercises in the NAFLD model and its potential protective role.

This study determined that endurance exercises significantly improve inflammation, liver dysfunction, and metabolic disorders resulting from a high-fat diet (HFD) along with liquid fructose. These findings indicate that reducing the inflammatory markers through endurance exercises is one of the critical mechanisms of exercise in treating NAFLD. These findings highlight the importance of endurance exercises in treating NAFLD.

#### 5. FUNDING

This work is based upon research funded by Iran National Science Foundation (INSF) under project No.4027128.

#### 6. ETHICAL APPROVAL STATEMENT

The animals were housed at a controlled room temperature ( $23\pm 2$  degrees Celsius), relative humidity ( $55\pm 10$ ), and a light/dark cycle of 12/12 h. Food and water were provided ad libitum during the experimental period. All procedures were performed under the guidelines established by the Animal Care and Research Ethics Committee of Kermanshah Razi University (IR.RAZI.REC.1402.073).

#### 7. DATA AVAILABILITY

The data supporting this study's findings are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### 8. CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## بررسی اثر ۸ هفته تمرینات استقامتی بر سطوح نشانگرهای التهابی (IL-6/ TNF- $\alpha$ ) و برخی پارامترهای متابولیکی در رتهای نر مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

وحید کاظمی زاده<sup>۱</sup>، امیرعباس منظمی<sup>۱\*</sup>، فخرالدین صبا<sup>۲</sup>، اندرو جی مک اینچ<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

<sup>۲</sup>گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

<sup>۳</sup>موسسه سلامت و ورزش، دانشگاه ویکتوریا، ملبورن، استرالیا.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۱۰

### چکیده

**مقدمه:** هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر مداخله تمرینات استقامتی (هوازی) بر سطوح نشانگرهای التهابی (IL-6/ TNF- $\alpha$ ) و برخی پارامترهای متابولیکی در رتهای نر مبتلا به کبد چرب غیرالکلی ناشی از رژیم غذایی پرچرب، به منظور بررسی امکان سنجی استفاده از تمرین ورزشی برای کاهش التهاب بود.

**روش کار:** در این راستا، تعداد ۴۴ سر رت نژاد ویستار به صورت تصادفی در دو گروه (I) رژیم غذایی استاندارد به تعداد ۲۲ سر رت و همچنین (II) تعداد ۲۲ سر رت در گروه رژیم غذایی پرچرب به همراه فروکتوز مایع (HFD+HF) با دسترسی آزاد قرار گرفتند. پس از ۱۷ هفته، دو رت در هر گروه قربانی شدند و بافت کبد برای مشاهده رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین گرفته شد. سپس، تعداد ۲۰ سر رت باقیمانده در گروه (I) به گروه کنترل (C)، گروه تمرین (T) و ۲۰ سر رت گروه (II) به گروه کبد چرب (FL) و گروه کبد چرب+تمرین (FL+T)، (هر گروه شامل ۱۰ سر رت) تقسیم شدند. در مرحله بعد گروه های T، مداخله تمرین استقامتی هشت هفته ای را تکمیل کردند. سپس، سطوح TNF- $\alpha$ ، IL-6، گلوکز، انسولین، مقاومت و حساسیت به انسولین اندازه گیری شد.

**یافته ها:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در اثر یک رژیم غذایی پرچرب به همراه فروکتوز مایع در رتهای گروه HFD+HF، بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) با عوارضی مانند: افزایش معنی داری در سطوح IL-6 و TNF- $\alpha$ ، اختلال عملکرد کبدی و اختلال پارامترهای متابولیک، ایجاد می شود ( $p < 0.001$ ). همچنین، تمرینات استقامتی با معکوس کردن روند بیماری اکثر این عوارض را بهبود میبخشد ( $p < 0.001$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج پژوهش حاضر میتوان نتیجه گیری کرد که بهبود نشانگرهای التهابی، اختلال عملکرد کبدی و اختلال پارامترهای متابولیک از طریق انجام تمرینات استقامتی یکی از مکانیسمهای کلیدی ورزش در درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی است، این امر میتواند اهمیت تمرینات استقامتی را در درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی نشان دهد.

**کلمات کلیدی:** بیماری کبد چرب غیرالکلی، سندرم متابولیک، تمرین هوازی، نشانگرهای التهابی  
IL-6، TNF- $\alpha$ ، مقاومت و حساسیت به انسولین.

### مقدمه

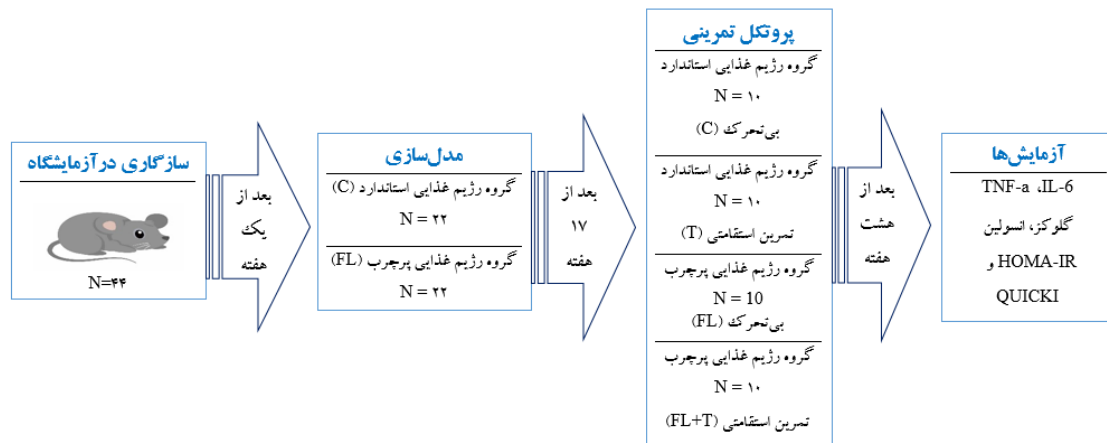
بیماری کبد چرب غیر الکلی (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) شایعترین بیماری مزمن کبدی است که اخیراً به علت افزایش میزان چاقی در جامعه در حال افزایش است (۱). شیوع جهانی NAFLD در بین بزرگسالان ۳۲ درصد و در بین مردان (۴۰ درصد) گزارش شده است که در مقایسه با زنان (۲۶ درصد) بیشتر است. شیوع جهانی NAFLD در طول زمان افزایش یافته است، به عنوان مثال آمارها نشان داده است که از ۲۶ درصد در مطالعات سال ۲۰۰۵، به ۳۸ درصد در مطالعات سال ۲۰۱۶ افزایش یافته است (۲). براساس پژوهشها شیوع NAFLD در ایران بالاتر از میانگین جهانی ۴۰/۰۸ درصد گزارش شده است (۳). اهمیت این بیماری به سبب تخریب سلولهای کبدی است که در صورت عدم تشخیص زودرس و درمان مناسب میتواند منجر به بیماری پیشرفته و غیر قابل برگشت کبدی به نام «سیروز» شود (۴). با توجه به اینکه کبد چرب نشانه‌هایی از درگیری کبد در بیماری مقاومت به انسولین (سندروم متابولیک) است، مرگ و میر ناشی از آن به‌صورت افزایش مرگ و میر به علت عوارض قلبی عروقی نشان داده می‌شود. به عبارتی دیگر به نظر می‌رسد که اکثر مبتلایان به کبد چرب قبل از ایجاد سیروز از عوارض قلبی و عروقی ناشی از سندروم متابولیک فوت میکنند (۵).

التهاب سیستمی در کبد چرب نقش مهمی دارد و سیتوکین‌هایی مترشحه از بافت کبد، چربی و عضلانی در بروز مقاومت انسولینی نقش بسزایی دارند (۶). همچنین بین چاقی، مقاومت به انسولین، آدیپوکین‌ها و سیتوکین‌های مرتبط با متابولیسم چربی و کربوهیدرات همبستگی وجود دارد (۷، ۸). مطالعات انجام شده نشان داده است که سیتوکین‌های التهابی نظیر فاکتور نکروز تومور آلفا (Tumor necrosis factor alpha: TNF- $\alpha$ ) و اینترلوکین-۶ (Interleukin-6: IL-6) در جمعیت‌های چاق و بیماری‌های وابسته به آن، نسبت به افراد دارای وزن نرمال، از سطوح بالاتری برخوردار هستند (۹، ۱۰). تولید مقادیر زیاد سیتوکین‌های التهابی مانند IL-6

و TNF- $\alpha$  در توسعه مقاومت انسولینی، کبد چرب، دیابت و سندروم متابولیک نقش دارند (۱۱). از سوی دیگر، TNF- $\alpha$  مسیر سیگنال‌دهی انسولین، از جمله فسفوریلاسیون پروتئین سوبسترای گیرنده انسولین (Phosphorylation of insulin receptor substrate: IRS)، را در شرایط پاتولوژیک مانند التهاب مزمن و شروع واکنش‌های فاز حاد با افزایش بقای سیگنال‌های التهابی و تحریک مرگ سلولی، مختل میکند (۱۲). با این حال، اگرچه به نظر می‌رسد IL-6 و TNF- $\alpha$  در پاتوژنز NAFLD دخیل است، نقش دقیق آن به‌طور کامل مشخص نشده است و مستلزم بررسی‌های بیشتری است.

اهداف اصلی درمانی برای بیماران NAFLD، کاهش یا متوقف کردن پیشرفت بیماری، بهبود استئاتوز، جلوگیری از التهاب، فیروز و در صورت امکان، درمان فیروز و سیروز کبدی است. خط درمانی مقدم برای NAFLD، کاهش وزن از طریق محدود کردن کالری دریافتی و یا فعالیت جسمانی می‌باشد که به منظور مدیریت NAFLD به کار گرفته می‌شوند (۱۳). در حال حاضر، پیشنهادات ورزشی شخصی برای انواع مختلف بیماران NAFLD اجرا نشده است. اگرچه مطالعات بالینی متعددی برای ارزیابی اثربخشی تمرینات ورزشی در درمان NAFLD انجام شده است، اما به دلیل تنوع روش‌های تمرینی، شاخص‌های تشخیصی و تعداد پایین نمونه‌ها در این پژوهش‌ها، نتیجه‌گیری منسجمی وجود ندارد (۱۴، ۱۵). زیرا برخی از انواع ورزش‌ها ممکن است منجر به آسیب‌های ورزشی شود و انتخاب ورزش مناسب برای هر فرد بیمار مهم است. این در حالی است که کماکان به ضرورت انجام پژوهش‌های بیشتر برای نتیجه‌گیری درباره‌ی شدت و بار تمرینی بهینه تأکید شده است (۱۶، ۱۷).

اگرچه توجه زیادی بر NAFLD متمرکز شده است، اما پاتوژنز آن همچنان تا حد زیادی مبهم باقی مانده است (۱۸). در این راستا، پژوهش‌های در مورد تأثیر ورزش در بیماری نظیر کبد چرب بر روی متغیرهای پروفایل لیپیدی (۱۹)، تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد و در نمونه‌های مبتلا به بیماری دیابت نوع ۲ (۲۰، ۲۱) انجام



شکل ۱: طرح کلی پژوهش.

سانتیگراد) و رطوبت نسبی (۵۵٪) قرار گرفتند. رت‌ها اجازه دسترسی آزاد به غذای استاندارد آزمایشگاهی و آب لوله‌کشی و سازگاری با آزمایشگاه را برای ۱ هفته قبل از شروع پروتکل آزمایشی داشتند. در مرحله بعد، تعداد ۲۲ سر رت در (I) گروه رژیم غذایی معمولی و تعداد ۲۲ سر رت در (II) گروه رژیم غذایی پرچرب ۶۰ درصد (High-fat diet: HFD) به همراه فروکتوز مایع ۲۵ درصد (High fructose: HF) با دسترسی آزاد به‌صورت تصادفی قرار گرفتند. پس از ۱۷ هفته، دو رت در هر گروه با رعایت اصول اخلاقی کشته شده و بافت کبد برای ارزیابی هیستولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (Histological stain hematoxylin-eosin: H&E) و اطمینان از ابتلا به کبد چرب غیرالکلی گرفته شد. سپس تعداد ۲۰ سر رت باقیمانده در گروه رژیم غذایی استاندارد به دو گروه کنترل (C)، گروه تمرین (T) و ۲۰ سر رت گروه HFD+HF به دو گروه کبد چرب (FL) و گروه کبد چرب+تمرین (FL+T) تقسیم شدند (هر گروه شامل ۱۰ سر رت). گروه‌های T مداخله ورزشی ۸ هفته‌ای را انجام دادند (شکل ۱).

لازم به ذکر است تغذیه گروه‌های رژیم غذایی استاندارد و گروه‌های رژیم غذایی پرچرب به همراه آب فروکتوز ۲۵ درصد تا پایان پژوهش ادامه داشت. محتوای خوراک پرچرب شامل: ذرت، کازئین، نشاسته ذرت، ساکارز،

شده است. با این حال، پژوهش‌های که با هدف تأثیر تمرین استقامتی بر سطوح نشانگرهای التهابی با شناسایی مسیر سیگنالینگ محور IL-6/ TNF- $\alpha$ /IRS در مدل NAFLD انجام شده باشد، بسیار محدود است. از سویی دیگر درمان NAFLD با استفاده از داروها در بیشتر موارد، پرهزینه، تهاجمی و همراه با وجود عوارض جانبی است، همچنین پیشگیری و درمان NAFLD مداخله مشترکی را می‌طلبد تا اثر درمانی بهتری نسبت به مداخله ساده داشته باشد. در این راستا، هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی (دویدن بر روی تردمیل) بر سطوح نشانگرهای التهابی، مقاومت و حساسیت به انسولین در رت‌های نر مبتلا به کبد چرب غیرالکلی بود که پیش‌بینی می‌شد تمرین استقامتی ممکن است به کاهش NAFLD از طریق کاهش عوامل ایجادکننده آن کمک کند.

### روش کار

#### حیوانات و گروه‌های آزمایشی

تعداد ۴۴ سر رت نر نژاد ویستار تازه از شیر گرفته شده از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه خریداری و به آزمایشگاه حیوانی منتقل شد. حیوانات مورد آزمایش در گروه‌های ۵ حیوانی در هر قفسه‌ای پلیکربنات تحت شرایط کنترل شده چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعته و دما (۲۳ ± ۲) درجه

جدول ۱: مشخصات خوراک های حیوانی

متغیر	رژیم غذایی استاندارد	رژیم غذایی پرچرب
پروتئین (%)	۲۳	۲۴
کربوهیدرات (%)	۵۰/۳	۲۶
چربی (%)	۵/۱	۳۵
چربی (% کالری)	۱۲	۶۰
کالری (% کالری / گرم)	۳/۱	۵/۲

۱۰ متر بر دقیقه و در محدوده ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی ( $VO_{2max}$ ) بود. پس از دو هفته اول به تدریج، هر ۲ هفته شدت و مدت فعالیت افزایش یافت و شیب ثابت ماند. در دو هفته پایانی، زمان فعالیت به ۴۰ دقیقه در روز و سرعت به ۲۵ متر بر دقیقه و در محدوده ۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی افزایش پیدا کرد. قبل و بعد از هر جلسه تمرین، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن رتھا در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است رتھای گروه (C) و گروه (FL) در دستگاه تردمیل با سرعت ۸ متر بر دقیقه و شیب صفر درجه به مدت ۵ دقیقه، ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته قرار گرفتند تا استرس قرارگیری در دستگاه تردمیل مرتبط با پروتکل تجربی را تقلید کنند. طرح پروتکل تمرین استقامتی در این مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است. در تمام طول دوره تمرین به هیچ عنوان از دستگاه شوک الکتریکی برای شرطی سازی حیوانات به دلیل انتقال استرس منفی به حیوان استفاده نشد. البته در هفته اول تمرین، از محرک صوتی برای شرطی شدن استفاده شد. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت ۹ الی ۱۱ صبح برگزار گردید.

#### ❖ آنالیز شاخص های خون

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه ها با شرایط کاملا مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ ساعت ناشتایی به منظور ترکیبی از کمترین اثرات حاد تمرین) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بیهوش شدند. برای تجزیه و تحلیل شاخص های خونی،

گلوتن ذرت، مخلوط روغنهای حیوانی و گیاهی، کربنات کلسیم، دی کلسیم فسفات، پریمیکس ویتامین و مواد معدنی بود. میزان درشت مغذی های غذای پرچرب شامل: پروتئین ۲۴ درصد، کربوهیدرات ۲۶ درصد، چربی ۳۵ درصد و سایر مواد می باشد که ۶۰ درصد کالری دریافتی از چربی بود (جدول ۱). همچنین محتوای خوراک استاندارد شامل: ذرت، کازئین، نشاسته ذرت، ساکارز، گلوتن ذرت، کربنات کلسیم، دی کلسیم فسفات، پریمیکس ویتامین و مواد معدنی بود. میزان درشت مغذیهای غذای استاندارد شامل: پروتئین ۲۳ درصد، کربوهیدرات ۵۰ درصد، چربی ۵ درصد و سایر مواد می باشد که ۱۰ درصد کالری دریافتی از چربی بود (جدول ۱).

#### ❖ پروتکل تمرین استقامتی

پس از اطمینان از ابتلا به کبد چرب غیرالکلی در رتھای مورد پژوهش، پروتکل تمرین استقامتی با مراجعه به پژوهش Rodrigues و همکاران (۲۲) به مدت هشت هفته اجرا شد. ابتدا به منظور خونگیری به شرایط آزمایش شامل نوارگردان و دستکاری، رتھا به مدت یک هفته، پنج جلسه در هفته و هر بار به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه و شیب صفر درجه با تردمیل مخصوص جوندگان فعالیت کردند. برنامه فعالیت تمرین استقامتی هشت هفته ای مبتنی بر اضافه بار شامل دویدن روی تردمیل پنج روز در هفته بود. برنامه تمرینی هوازی رتھا روی تردمیل در دو هفته اول شامل ۱۵ دقیقه فعالیت با شدت ۱۰ متر در دقیقه و شیب ۵٪ بود. شدت برنامه تمرینی با توجه به مقدار اکسیژن مصرفی و برابر با سرعت

جدول ۲: پروتکل برنامه تمرین استقامتی در هفته‌های مختلف

هفته	زمان (دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)	شیب (%)
اول	۱۵	۱۰	۵
دوم	۱۵	۱۰	۵
سوم	۲۰	۱۵	۵
چهارم	۲۰	۱۵	۵
پنجم	۳۰	۲۰	۵
ششم	۳۰	۲۰	۵
هفتم	۴۰	۲۵	۵
هشتم	۴۰	۲۵	۵

### ❖ تحلیل آماری

جهت بررسی توزیع طبیعی داده‌ها، آزمون Shapiro-Wilk به کار برده شد. برای تحلیل داده‌ها از روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری  $p=0/05$  برای رد یا قبول فرضیات در نظر گرفته شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ (IBM Corporation, Armonk, NY) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

### ≡ یافته‌ها

با توجه به آنالیز میانگین‌های گروه‌های مورد مطالعه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای NAFLD موجب افزایش معنی‌داری در سطوح IL-6 و TNF- $\alpha$  در موش‌های مبتلا به NAFLD در مقایسه با گروه کنترل شده است ( $p<0/001$ ). همچنین مشخص شد که سطوح IL-6 و TNF- $\alpha$  در گروه FL+T نسبت به گروه FL به طور معنی‌داری پایین‌تر است ( $p<0/001$ ). این نتایج بیانگر این واقعیت است که تمرین استقامتی منجر به کاهش سطوح نشانگرهای التهابی در گروه FL+T و گروه T می‌شود. این مسئله نشانگر اثر محافظتی تمرینات استقامتی از بافت کبد رت‌های مبتلا به NAFLD از طریق معکوس کردن روند ایجادکننده پاتوژنز NAFLD می‌باشد در پژوهش حاضر مشخص شد که تحمل گلوکز و حساسیت به انسولین در رت‌های گروه FL در مقایسه با رت‌های گروه C، T و FL+T کاهش داشته و رت‌های

نمونه خون از دهلیز راست رت‌های بی‌هوش جمع‌آوری شد. برای سنجش سطوح نشانگرهای التهابی، گلوکز و انسولین نمونه‌های خونی با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از جدا کردن سرم، در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  - نگهداری گردید. در پژوهش حاضر جهت سنجش مقادیر سطوح نشانگرهای التهابی از کیت‌های شرکت کارمانیا ژن، ساخت ایران و برای اندازه‌گیری گلوکز و انسولین سرم از کیت‌های شرکت دلتا درمان، ساخت ایران به روش (Enzyme-Linked Immunosorbent) ELISA (Assay) طبق دستورالعمل‌های ارائه شده توسط سازنده انجام شد. سپس براساس نتایج به‌دست‌آمده از مقادیر انسولین و گلوکز خون، دو فاکتور مقاومت به انسولین (HOMA-IR) و حساسیت به انسولین (QUICKI) با استفاده از معادله استاندارد محاسبه شد (۲۳).

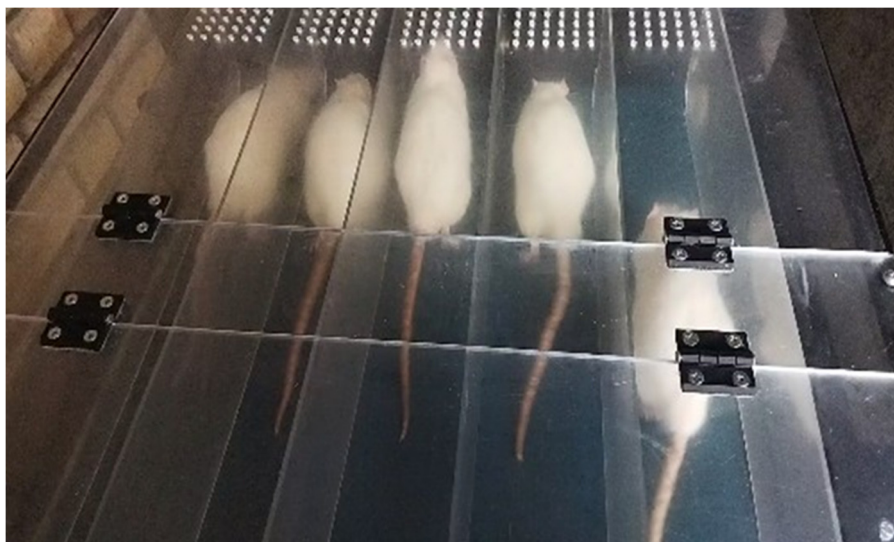
معادله ۱:

$$HOMA-IR = \frac{Glucose \times Insulin}{405}$$

مقادیر گلوکز و انسولین بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر می‌باشند.

معادله ۲:

$$QUICKI = \frac{1}{\log(\text{fasting insulin } \mu\text{U} / \text{mL}) + \log(\text{fasting glucose } \text{mg} / \text{dL})}$$



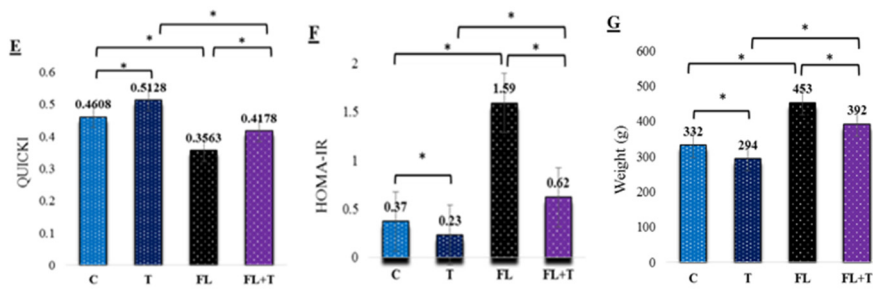
شکل ۲: انجام تمرین استقامتی رت های مورد مطالعه بر روی تردمیل.



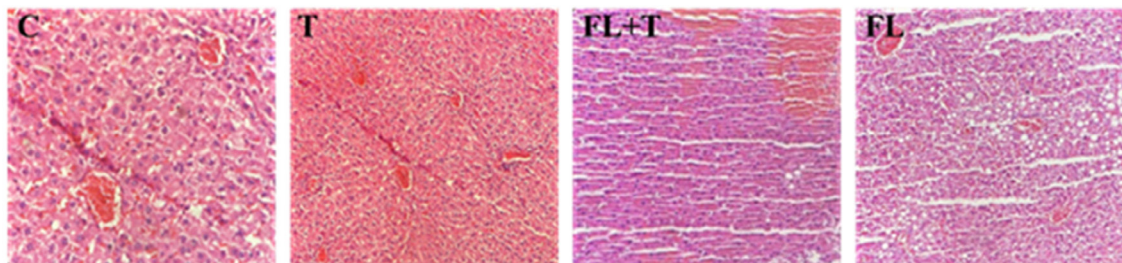
شکل ۳: نمونه گیری از خون و بافت کبد رت های مورد مطالعه.

همچنین، تجزیه و تحلیل تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت کبد رت های مورد مطالعه نشان داد که تغذیه با رژیم غذایی پرچرب همراه با فروکتوز مایع باعث افزایش لیپید (استئاتوز ماکروویکولار) در بافت کبد می شود. از سوی دیگر، انجام تمرینات استقامتی در گروه های T و FL+T منجر به بهبود شاخص های لیپیدی می شود. همچنین کاهش استئاتوز کبدی در گروه FL+T مشاهده شد. علاوه بر این، اندازه قطرات چربی کبد و همچنین شکل آنها (تغییر از شکل ماکروویکولار به میکروویکولار)، در گروه FL+T نسبت به گروه FL به طور قابل توجهی بهبود یافت (شکل ۵). همچنین، رنگ آمیزی HE بافت کبد

گروه T و FL+T افزایش تحمل گلوکز و حساسیت به انسولین بهتری را در مقایسه با رت های گروه FL نشان دادند که این تفاوت از نظر آماری معنادار بود ( $p < 0/001$ ). علاوه بر این، نتایج حاصل از آنالیز مقادیر سرمی انسولین و شاخص مقاومت به انسولین نشان داد که مقادیر انسولین و HOMA-IR به طور قابل توجهی در رت های گروه FL افزایش یافته است، در حالیکه این مقادیر در رت های گروه T، C و FL+T به طور قابل توجهی پایین بود ( $p < 0/001$ ). این نتایج نشانگر این واقعیت است که ورزش استقامتی می تواند وضعیت تحمل گلوکز، سطوح انسولین، مقاومت و حساسیت به انسولین را بهبود بخشد (جدول ۴).



شکل ۴: بررسی سطوح نشانگرهای التهابی و پارامترهای متابولیکی در موش‌های صحرایی نر مبتلا به بیماری کبد چرب غیرالکلی در گروه‌های مورد مطالعه: گروه کنترل (C)، گروه تمرین استقامتی (T)، گروه کبد چرب غیرالکلی (FL) و گروه کبد چرب غیرالکلی به همراه تمرین استقامتی (FL+T). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد ارائه شده است. A: نمودار مقایسه شاخص TNF-a، B: نمودار مقایسه شاخص IL-6، C: نمودار مقایسه شاخص گلوکز، D: نمودار مقایسه شاخص انسولین، E: نمودار مقایسه شاخص حساسیت به انسولین، F: نمودار مقایسه شاخص مقاومت به انسولین، G: نمودار مقایسه شاخص وزن بدن. C: کنترل، T: تمرین استقامتی، FL: کبد چرب غیرالکلی، FL+T: کبد چرب غیرالکلی + تمرین استقامتی. \*: تفاوت معنی‌داری در سطح ( $p < 0.001$ ).



شکل ۵: بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد در گروه‌های مورد مطالعه: گروه کنترل (C)، گروه تمرین استقامتی (T)، گروه کبد چرب غیرالکلی (FL) و گروه کبد چرب غیرالکلی به همراه تمرین استقامتی (FL+T).

گلوکز ناشتا و حساسیت به انسولین در گروه‌های تمرین استقامتی نسبت به گروه‌های کنترل به صورت معناداری کاهش پیدا کرده در حالیکه به طور همزمان سطوح مقاومت به انسولین افزایش پیدا کرده است. براساس نتایج ارائه شده در پژوهش حاضر تأثیر تمرینات استقامتی بر NAFLD با شناسایی اثر محور IL-6/ TNF- $\alpha$  / IRS در پاتوژنز NAFLD در کبد بررسی شده است. امروزه مشخص شده است که ورزش منظم عاملی تأثیرگذار در پیشگیری از بیماری‌های کبدی در افراد سالم و مبتلایان به بیماری‌های متابولیک است (۲۴). در حمایت از نتایج مطالعه حاضر، محمدپور و همکاران (۲۵) نشان دادند که ورزش باعث کاهش تجمع چربی در کبد موش‌های سالم می‌شود. همسو با این نتایج، Ruan و همکاران (۲۶) نیز گزارش دادند که تمرین استقامتی (با شدت کم و شدت متوسط) باعث بهبود چربی خون و آسیب کبدی در موش‌های NAFLD می‌شود. با این حال،

نشان داد که رت‌هایی که به مدت ۱۷ هفته با HFD با فروکتوز تغذیه شدند، ظاهر معمولی نفوذ اسید چرب در کبد را نشان دادند، که نشان می‌دهد متابولیسم چربی مختل شده است و تمرین استقامتی به طور موثر این ویژگی‌های پاتولوژیک را کاهش می‌دهد. قطرات چربی در گروه FL+T کوچکتر و از نظر محتوای کمتر بود، که نشان می‌دهد رسوب چربی در کبد کاهش یافته است.

### بحث

در پژوهش حاضر تأثیر تمرینات استقامتی بر نشانگرهای بالینی بافت کبد رت‌های نر در مدل حیوانی مبتلا به NAFLD بررسی شده است و این فرضیه که تمرینات استقامتی می‌تواند شروع NAFLD را با معکوس کردن عوامل ایجادکننده آن بهبود بخشد، مورد تأیید قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، مشاهده شد که سطوح نشانگرهای التهابی IL-6 و TNF-a، مقادیر انسولین،

نظر مکانیکی IR در بافتهای محیطی منجر به سرکوب ناقص لیپاز می شود که در نتیجه سبب افزایش لیپولیز و آزادسازی اسیدهای چرب آزاد (FFAs) می شود که توسط کبد جذب می گردد (۳۳). بنابراین، بهبود IR ممکن است انتقال FFA به کبد را کاهش دهد. علاوه بر این، IR در عضله اسکلتی باعث انتقال گلوکز به کبد می شود که سوخت برای سنتز FFA de novo است (۳۴). ورزش ممکن است مکانیسم های اپیژنتیکی مانند کاهش هیپرمتیلاسیون DNA را نیز القا کند که به طور مثبت بر لیپوژنز de novo اثر میگذارد (۳۵). علاوه بر این، مدل های حیوانی و پژوهشها در مقیاس کوچک نشان میدهند که ورزش بر عملکرد میتوکندری کبد تاثیر میگذارد و میتواند از طریق تنظیم آنزیم های آنتی اکسیدانی و نشانگرهای ضد التهابی بر التهاب تاثیر بگذارد (۳۶).

مسیرهای متابولیک، قلبی تنفسی و غدد درونریز که توسط تمرینات استقامتی مزمن هدف قرار میگیرند به طور گسترده در پژوهش های پیشین شناسایی شده اند. در مطالعات پیشین نشان داده شده بود که تمرینات ورزشی در انسان و جوندگان با مراحل مختلف توسعه استئاتوهپاتیت غیر الکلی (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) مقابله میکند و ورزش به طور مثبت مشخصات ژنتیکی کبد موش را از طریق کاهش مسیرهای مربوط به مقاومت به انسولین، استئاتوز، فیبروز و التهاب تعدیل میکند، که این امر یک استراتژی درمانی مهم برای مقابله با بیماری های کبدی میباشد (۳۷). در مطالعه حاضر از یک پروتکل تمرینات استقامتی بدون استرس استفاده شده است که طیف آسیب های کبدی مشاهده شده در NAFLD را بهبود می بخشد. این پروتکل تمرینی به رت ها اجازه می دهد تا برای دوره های طولانی با یک رویکرد کنترل شده ورزش کنند. افزایش آهسته سرعت و شدت تمرین به حیوان اجازه می دهد بدون استفاده از هرگونه محرک نامطلوب، مانند شوک الکتریکی خود را هماهنگ کند (۳۸). در پژوهش حاضر، کاهش سطوح IL-6، TNF- $\alpha$  و بهبود ساختاری بافت کبد ناشی از تمرینات استقامتی در مدل NAFLD و نقش محافظتی

ورزش با شدت متوسط تأثیر بیشتری بر افزایش توانایی آنتی اکسیدانی و مهار آپوپتوز سلولهای کبدی را نشان داده است. Ghamarchehreh و همکاران (۱۹) نیز گزارش دادند که تمرین هوازی نسبت به تمرینات مقاومتی در بهبود نیمرخ چربی خون در سالمندان مبتلا به NAFLD موثرتر بوده و میتواند در مدیریت این بیماری نقش داشته باشد. قرقانی و همکاران (۲۷) همچنین گزارش دادند که تمرین استقامتی به عنوان یک درمان غیردارویی، اثرات کاهش چربی خود را با القای اتوفاژی اعمال می کند. در ارتباط با اثر تمرینات ورزشی بر سیتوکینهای التهابی و پیش التهابی، Khaleghzadeh و همکاران (۲۸) نشان دادند که هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا منجر به کاهش قابل توجه IL-6 و TNF- $\alpha$  در سطوح پلاسما و افزایش قابل توجه  $VO_{2max}$  می شود. همسو با این نتایج، Wang و همکاران نیز نشان دادند که ورزش هوازی منجر به بهبود سطوح IL-6 و TNF- $\alpha$ ، سطوح گلوکز و اختلالات متابولیسم لیپید در موش های NAFLD می شود (۲۹). تمرین استقامتی با شدت و مدت کافی اثرات مفیدی بر حساسیت به انسولین و تغییر گیرنده های عضلات اسکلتی دارد که میتواند ناشی از کاهش وزن و تنظیم مثبت بیان پروتئین انتقال دهنده گلوکز در عضله اسکلتی باشد (۳۰). در بیماران NAFLD لیپوژنز همواره بالاست که منجر به تجمع لیپید در سلولهای کبدی و افزایش میزان تری گلیسرید در گردش خون می شود، این عمل با تشدید بیماری یک چرخه معیوب ایجاد کرده که در آن غلظت بالای چربی داخل کبدی، عمل انسولین بر کبد را مهار میکند و منجر به میزان بالای انسولین سرم و افزایش چربی داخل کبدی میگردد. تمرینات استقامتی به وسیله بهبود کنترل قند، اکسیداسیون چربی از طریق افزایش انتقال گلوکز در عضله اسکلتی، بیان و فعالیت آنزیم گلیکوزن سنتتاز در گیرنده های انسولینی، ذخیره گلیکوزن در عضله و کبد، افزایش سنتز تری گلیسرید در سلول های عضلانی، کاهش انباشت متابولیت های اسیدهای چرب و سرکوب حالت التهابی مرتبط با مقاومت به انسولین، این چرخه را نقض می کند (۳۱، ۳۲). از

صحرائی مبتلا به کبد چرب غیر الکلی ناشی از HFD به همراه فرکتوز مایع را بهبود میبخشد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که کاهش سطوح نشانگرهای التهابی و بهبود پارامترهای متابولیکی از طریق انجام تمرینات استقامتی یکی از مکانیسم‌های کلیدی تمرینات استقامتی در درمان NAFLD است. نتایج این مطالعه میتواند اهمیت تمرینات استقامتی را در درمان NAFLD نشان دهد.

### منابع مالی

این اثر تحت حمایت مادی بنیاد ملی علم ایران (INSF) برگرفته شده از طرح شماره «۴۰۲۷۱۲۸» انجام شده است.

### بیانیه تایید اخلاقی

حیوانات در دمای اتاق کنترل شده ( $23 \pm 2$ ) درجه سانتیگراد)، رطوبت نسبی ( $55 \pm 10\%$ ) و چرخه نور/تاریکی  $12/12$  ساعت قرار گرفتند. غذا و آب به طور آزاد در طول دوره آزمایش ارائه شد. کلیه مراحل تحت دستورالعمل‌های تعیین شده توسط کمیته اخلاق مراقبت و پژوهش از حیوانات دانشگاه رازی کرمانشاه (IR.RAZI.REC.1402.073) انجام شد.

### در دسترس بودن داده‌ها

داده‌های حمایت‌کننده از یافته‌های این مطالعه در صورت درخواست معقول از نویسندگان مربوطه در دسترس است.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلان می‌دارند که هیچ تعارض منافی ندارند.

بالقوه آن نشان داده شده است. علاوه بر این، نشان داده شد که مداخله ورزشی توانسته است استئاتوز ناشی از HFD به همراه فرکتوز را در بررسی‌های بافت‌شناسی معکوس نماید، این یافته‌ها نشان‌دهنده آن است که تغییر کامل در سبک زندگی و بهره‌گیری از تمرینات استقامتی، بهترین رویکرد برای درمان NASH میباشد.

در پژوهش حاضر شواهدی در مورد اثرات ورزش بر سطوح نشانگرهای التهابی با محور IL-6/TNF- $\alpha$ /IRS در رت‌های مبتلا به NAFLD ارائه شده است. با این حال، محدودیت‌هایی برای پژوهش حاضر وجود داشت. در این مطالعه، فقط رت‌های نر بررسی شده است. اگرچه شواهد زیادی نشان می‌دهند که در انسان، مردان در معرض خطر و شدت بالاتری NAFLD هستند (۳۹)، اما در زنان پس از یائسگی نیز NAFLD به میزان بالایی رخ میدهد (۴۰). با این حال، در این پژوهش به دلیل تغییرات هورمونی در مدل رت‌های ماده و همچنین این نکته که رت‌های ماده می‌توانند در واحد زمان، مسافت طولانی‌تری را بدون (محدوده تطبیقی بهتر در  $VO_{2max}$  و رابطه معکوس توده عضلانی اسکلتی با  $VO_{2max}$ ) و در مقایسه با رت‌های نر پروتکل تمرینات استقامتی را بهتر تکمیل کنند (۴۱) و همچنین رت‌های نر ضعیف‌ترین پاسخ‌های ورزشی در کبد را می‌توانند نشان دهند، لذا فقط از رت‌های نر استفاده شده است. با این حال، رت‌های ماده نیز باید تحت همین شرایط مورد بررسی قرار گیرند. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده اثرات تمرینات استقامتی بر روی هر دو جنس در نظر گرفته شود.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نشان داده شده که تمرینات استقامتی به طور قابل توجهی سطوح نشانگرهای التهابی و همچنین پارامترهای متابولیک در موش‌ها

## REFERENCES

1. Farzanegi P, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci*. 2019;19(7):994-1003.
2. Teng ML, et al. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2023;29(Suppl):S32-s42.
3. Riazi K, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7(9):851-861.
4. Gillissen A, Schmidt HH-J. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: A narrative review. *Adv Ther*. 2020;37(4):1279-1301.
5. Salehisahlabadi A, Jadid H. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in Iranian children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *J Sabzevar Univ Med Sci*. 2018;25(4):487-494.
6. Rohnejad B, Monazzami A. Effects of high-intensity intermittent training on some inflammatory and muscle damage indices in overweight middle-aged men. *Apunts Sports Med*. 2023;58(217):100404.
7. Francischetti E, Genelhu V. Obesity-hypertension: an ongoing pandemic. *Int J Clin Pract*. 2007;61(2):269-280.
8. Kazemizadeh V, Behpour N. The Effect of Sleep Deprivation on Objective and Subjective Physiological Responses of Student-Athletes. *J Health Saf Work*. 2022;12(1):222-236.
9. Osborn O, et al. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. *Cytokine*. 2008;44(1):141-148.
10. Vinagre I, et al. Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(1):1-7.
11. Leick L, et al. Adipose tissue interleukin-18 mRNA and plasma interleukin-18: effect of obesity and exercise. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(2):356-363.
12. An JN, et al. Circulating tumour necrosis factor receptors 1 and 2 predict contrast-induced nephropathy and progressive renal dysfunction: a prospective cohort study. *Nephrology (Carlton)*. 2015;20(8):552-559.
13. Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):637-653.
14. Abdelbasset WK, et al. Effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous aerobic exercise on diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease: A comparative randomized controlled trial. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(10):e19471.
15. Jia GY, et al. [Effect of aerobic exercise and resistance exercise in improving non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2018;26(1):34-41.
16. Słomko J, et al. Evidence-Based Aerobic Exercise Training in Metabolic-Associated Fatty Liver Disease: Systematic Review with Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2021;10(8).
17. Machado MV. Aerobic Exercise in the Management of Metabolic Dysfunction Associated Fatty Liver Disease. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:3627-3645.
18. Lebeau-pin C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018;69(4):927-947.
19. Ghamarchehreh ME, Shamsoddini A, Alavian SM. Investigating the impact of eight weeks of aerobic and resistance training on blood lipid profile in elderly with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2019;12(3):190-196.
20. Ness H, et al. Acute high-intensity aerobic exercise increases gene expression of calcium-related proteins and activates endoplasmic reticulum stress responses in diabetic hearts. *Comp Exerc Physiol*. 2021;17(2):123-135.
21. Bahmani M, et al. The effect of the aerobic continues versus high-intensity interval training on IRE1 expression and its correlation with insulin resistance index of liver tissue in rats with type 2 diabetes mellitus. *Razi J Med Sci*. 2020;26(12):67-77.
22. Rodrigues B, et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.
23. Mohammadi S, Monazzami A, Alavimilani S. Effects of eight-week high-intensity interval training on some metabolic, hormonal and cardiovascular indices in women with PCOS: a randomized controlled trail. *BMC Sports Sci Med Rehabil*. 2023;15(1):47.
24. Hajjighasem A, et al. Effects of resveratrol, exercises and their combination on Farnesoid X receptor, Liver X receptor and Sirtuin 1 gene expression and apoptosis in

- the liver of elderly rats with nonalcoholic fatty liver. *PeerJ*. 2018;6:e5522.
25. Mohammadpour-Asl S, et al. Endoplasmic reticulum stress PERK-ATF4-CHOP pathway is involved in non-alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetic rats: The rescue effect of treatment exercise and insulin-like growth factor I. *Heliyon*. 2024;10(5):e27225.
  26. Ruan L, et al. Effect of Different Exercise Intensities on Hepatocyte Apoptosis in HFD-Induced NAFLD in Rats: The Possible Role of Endoplasmic Reticulum Stress through the Regulation of the IRE1/JNK and eIF2 $\alpha$ /CHOP Signal Pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6378568.
  27. Ghareghani P, et al. Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. *Obes Res Clin Pract*. 2018;12(Suppl 2):80-89.
  28. Khaleghzadeh H, et al. Effect of high intensity interval training along with Oligopin supplementation on some inflammatory indices and liver enzymes in obese male Wistar rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Med*. 2020;17:100177.
  29. Wang GH, et al. Effects of aerobic exercise and resveratrol on adipocytokines in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Sports*. 2023;38(1):57-67.
  30. Mohammad Zamani T, Kazemizadeh V, Babaei N. The Effect of Aerobic Activity along with Green Tea and Coffee Consumption on Fat Oxidation and Blood Pressure in Overweight Girls. *J Isfahan Med Sch*. 2023;41(714):234-242.
  31. 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. *Feyz Med Sci J*. 2016;20(3):282-296.
  32. Nasiri M, et al. The Effect of High Intensity Intermittent and Combined (Resistant and Endurance) Trainings on Some Anthropometric Indices and Aerobic Performance in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized Controlled Clinical Trial Study. *Int J Fertil Steril*. 2022;16(4):268-274.
  33. Lavoie JM, Gauthier MS. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(12):1393-409.
  34. Rabøl R, et al. Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13705-9.
  35. Zhou D, et al. High fat diet and exercise lead to a disrupted and pathogenic DNA methylome in mouse liver. *Epigenetics*. 2017;12(1):55-69.
  36. Taran S, Ghorbanian B, Tutunchi H. The effect of eight weeks of Pilates exercise on serum levels of fibroblast growth factor 21 (FGF21), insulin resistance index and lipid profile in women with non-alcoholic fatty liver disease. *J Appl Health Stud Sport Physiol*. 2024.
  37. Melo L, et al. Effect of endurance exercise training on liver gene expression in male and female mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2021;46(4):356-367.
  38. Melo L, Hagar A. How to train a mouse-methodological issues in pre-clinical exercise oncology. *Am J Cancer Res*. 2019;9(6):1246-1253.
  39. Ballestri S, et al. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv Ther*. 2017;34(6):1291-1326.
  40. Lonardo A, et al. Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatology*. 2019;70(4):1457-1469.
  41. Li X, Wang Z, Klaunig JE. The effects of perfluorooctanoate on high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Toxicology*. 2019;416:1-14.