

## Synergistic Effects of the Aerobic Training and Capsaicin on the Expression level of AMP-Activated Protein Kinase and Protein Kinase B Gene of Liver Tissue in Rat Fed a High-Fat Diet

Torabi Palat Kaleh G\*<sup>1</sup>, Sadeghi A<sup>2</sup>, Abdi A<sup>1</sup>

1- Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

2- Department of Sport Sciences, Faculty of Social Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

\*Corresponding author. Tel: +989118444736, Fax: +981143217009, E-mail: info@ghasemtorabi.ir

Received: Aug 4, 2022

Accepted: Oct 3, 2022

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Obesity and a high-fat diet (HFD) lead to metabolic disorders in the liver by affecting the signaling pathways of fat and glucose metabolism. Exercise and dietary habits are of special interest to prevent and counteract obesity and its associated metabolic disorders. Also, Capsaicin ameliorates diet-induced obesity in rodents and humans. The aim of the present study was to examine the effect of aerobic exercise and capsaicin on the gene expression level of AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase B (Akt) in the liver of HFD rats.

**Methods:** in this experimental study, 40 male Wistar rats were fed a normal diet (ND, n=8) or high-fat diet (HFD) (n=32) for 8 weeks. After 8 weeks, all rats were divided into 5 groups: normal diet (ND), high-fat diet (HFD), high-fat diet-training (HFDT), high-fat diet-capsaicin (HFDCap), high-fat diet-training-capsaicin (HFDTCap). Training groups have performed a moderate- intensity aerobic running program (60-50% VO<sub>2</sub>max, at 15-25 m/min, 30-60 min/day, and 5 days/week) on a motor-driven treadmill for eight weeks. Capsaicin (4 mg/kg/day) was administered orally, by gavage, once a day.

**Results:** Induction of diabetes was associated with decreased AMPK expression ( $p=0.0001$ ) and increased Akt ( $p=0.0001$ ). The results showed that training and capsaicin significantly increased AMPK expression ( $p=0.032$  and  $p=0.045$ , respectively) and decreased Akt expression ( $p=0.045$  and  $p=0.049$ , respectively) in HFD rat hepatocytes. Also, the interaction of training and capsaicin had a significant effect on the expression of AMPK ( $p=0.017$ ) and Akt ( $p=0.0001$ ).

**Conclusion:** The results showed that HFD impaired hepatocyte function and that aerobic exercise and capsaicin increased lipogenesis with increasing AMPK and decreasing Akt expression. However, the interaction effect of training with capsaicin was greater.

**Keywords:** Obesity; Exercise; Liver; Lipogenesis; Capsaicin

# اثرات هم‌افزایی تمرین هوازی و کپسایسین بر بیان ژن پروتئین کیناز فعال شده با AMP و پروتئین کیناز B بافت کبد در موش‌های صحرایی تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب

قاسم ترابی پلت کله<sup>۱\*</sup>، عباس صادقی<sup>۲</sup>، احمد عبدی<sup>۱</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲. گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم اجتماعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ه)، قزوین، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۱۸۴۴۷۳۶ فاکس: ۰۱۱۴۳۲۱۷۰۰۹ پست الکترونیک: info@ghasemtorabi.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** چاقی و رژیم غذایی پرچرب (HFD) با تأثیر بر مسیرهای سیگنالینگ موثر بر متابولیسم چربی و گلوکز باعث اختلالات متابولیکی در کبد می‌شود. فعالیت ورزشی و عادت‌های غذایی برای پیشگیری و مقابله با چاقی و اختلالات متابولیکی مرتبط با آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همچنین کپسایسین چاقی ناشی از رژیم غذایی را در جوندگان و انسان‌ها بهبود می‌بخشد. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثر تمرین هوازی همراه با کپسایسین بر بیان پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) و پروتئین کیناز B (Akt) بافت کبدی موش‌های تغذیه شده با HFD بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار به مدت ۸ هفته با رژیم غذایی نرمال (ND, n=۸) و رژیم غذایی پرچرب (HFD) (n=۳۲) تغذیه شدند. بعد از هشت هفته همه موش‌ها به ۵ گروه: رژیم غذایی نرمال (ND)، رژیم غذایی پرچرب (HFD)، رژیم غذایی پرچرب-تمرین (HFDT)، رژیم غذایی پرچرب-کپسایسین (HFDCap) و رژیم غذایی پرچرب-تمرین-کپسایسین (HFDTCap) تقسیم شدند. گروه‌های تمرین به مدت هشت هفته برنامه دویدن هوازی با شدت متوسط (۶۰-۵۰٪ VO<sub>2</sub>max، ۱۵-۲۵ متر/دقیقه، ۶۰-۳۰ دقیقه/روز، پنج روز/هفته) را روی تردمیل انجام دادند. کپسایسین (۴ mg/kg/day) یک بار در روز به صورت خوراکی با گاوآذ خورانده شد.

**یافته‌ها:** القای دیابت با کاهش بیان AMPK ( $p=0/0001$ ) و افزایش Akt ( $p=0/0001$ ) همراه بود. نتایج نشان داد که تمرین و کپسایسین باعث افزایش معنی‌داری در بیان AMPK (به ترتیب  $p=0/032$  و  $p=0/045$ ) و کاهش بیان Akt (به ترتیب  $p=0/045$  و  $p=0/049$ ) سلول‌های کبدی موش‌های صحرایی HFD شد. همچنین تعامل تمرین با کپسایسین تأثیر معنی‌داری بر بیان AMPK ( $p=0/017$ ) و Akt ( $p=0/0001$ ) داشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که HFD باعث اختلال در عملکرد سلول‌های کبدی شده و تمرین هوازی و کپسایسین با افزایش AMPK و کاهش Akt، احتمالاً می‌تواند لیپوژنز کبدی را بهبود ببخشد. با این وجود اثر تعامل تمرین همراه با کپسایسین بیشتر بود.

**واژه‌های کلیدی:** چاقی، فعالیت ورزشی، کبد، لیپوژنز، کپسایسین

پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۱

دریافت: ۱۴۰۱/۵/۱۳

است [۱]. افزایش چاقی ناشی از کاهش فعالیت‌بدنی و مصرف بیش از حد مواد غذایی بوده که به یک نگرانی بهداشت جهانی تبدیل شده است. از سال ۱۹۸۰، اضافه

**مقدمه**  
شیوع چاقی در سراسر جهان در ۵۰ سال گذشته، در بزرگسالان و کودکان بدون توجه به سن افزایش یافته

وزن و چاقی به حدی در جهان افزایش یافته است که تقریباً یک سوم جمعیت دنیا اکنون دارای اضافه وزن یا چاق هستند [۱]. علاوه بر این، چاقی به عنوان یک خطر برای بیماری‌های متابولیک مختلف از جمله دیس لیپیدمی، دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی (CVD)، سرطان و بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD)<sup>۱</sup> شناخته شده است [۲]. تجمع چربی در کبد در نتیجه افزایش مصرف چربی در رژیم غذایی، چاقی و همچنین کاهش عملکرد متابولیک مرتبط با کاهش عملکرد کبد رخ می‌دهد. در واقع تجمع چربی کبدی نتیجه مقدار بیشتری از جذب و یا سنتز چربی نسبت به اکسیداسیون چربی و آزاد شدن آن در گردش خون است [۳]. در میان مولکول‌های سیگنال‌دهنده مختلف در تنظیم حساسیت کبدی به انسولین و متابولیسم چربی، پروتئین کیناز B (Akt) و پروتئین کیناز فعال شده میتوژن (AMPK) برجسته‌ترین سیگنال‌های موثر بر حساسیت به انسولین، متابولیسم چربی و انرژی هستند. چاقی ناشی از رژیم غذایی پرچرب و حتی ژنتیکی، احتمالاً به دلیل تغییرات در مواد مغذی، ATP و سطوح سیتوکین‌های پیش التهابی، تنظیم Akt و AMPK را به خطر می‌اندازد [۴]. با استفاده از مدل موش‌هایی که دستکاری ژنتیکی شدند، نقش‌های مختلف Akt و AMPK در لیپوژنز کبدی و متابولیسم انرژی در شرایط مقاومت به انسولین و چاقی ناشی از رژیم غذایی پرچرب شناخته شد [۵]. Akt، به ویژه Akt2، برای فعال‌سازی پروتئین متصل‌کننده عناصر تنظیم‌کننده استرول 1c (SREBP1c)، لیپوژنز و تجمع چربی در شرایط فشار متابولیکی ضروری است [۵]. از سوی دیگر، AMPK عملکرد SREBP1c، تجمع چربی، استئاتوز کبدی و چربی را مهار می‌کند [۶]. از آنجا که AMPK و Akt ممکن است باعث محافظت در برابر چاقی، تجمع چربی‌های کبدی و مقاومت به

<sup>1</sup> Non-alcoholic Fatty Liver Disease

انسولین ناشی از چاقی شود، مسیر سیگنالینگ AMPK و Akt یک هدف امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان بیماری‌های متابولیکی است [۷]. با این وجود، تعامل بین این دو مولکول سیگنالینگ متضاد در رشد، متابولیسم چربی و انرژی در چاقی و استئاتوز کبدی به خوبی شناخته نشده است. از طرفی نشان داده شده که کاهش وزن می‌تواند مقاومت به انسولین، اختلال تحمل گلوکز و اختلالات چربی خون را در افراد چاق و دیابتی بهبود بخشد. فعالیت ورزشی و تغییر در رژیم غذایی بهترین روش برای کاهش وزن می‌باشد. نشان داده شده که کاهش محتوای چربی کبدی به دنبال فعالیت ورزشی می‌تواند حتی بدون تغییر در کاهش وزن نیز رخ دهد [۸]. در موش‌های چاق نشان داده شد که دویدن با بهبود عملکرد Akt و سیگنال‌دهی انسولین در سطح سلول‌های کبدی همراه است [۹]. همچنین نشان داده شده که تمرین هوازی باعث افزایش بیان AMPK کبدی در موش‌های HFD می‌شود [۱۰]. در مطالعات حیوانی نیز مشاهده شده که تمرین هوازی با افزایش در میزان بیان ژن AMPK و PI3K، باعث بهبود عملکرد سلول‌های کبدی در موش‌های سالمند می‌شود [۱۱]. با این وجود در برخی پژوهش‌ها مشاهده شده که علیرغم کاهش وزن، بهبودی در هیستولوژی بافت کبد رخ نمی‌دهد [۱۲]. علاوه بر فعالیت ورزشی، به موازات افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی کشورها به‌ویژه در حوزه گروه‌های خاص، کاربرد درمان‌های غیردارویی از جمله درمان‌ها و شیوه‌های پیشگیرانه طب سنتی و مکمل روزبه‌روز اهمیت بیشتری یافته است که از مهم‌ترین این روش‌ها می‌توان به اصلاح رژیم غذایی، استفاده از گیاهان دارویی و اصلاح زندگی اشاره کرد [۱۳]. کپسایسین به عنوان یک ماده ضد چاقی مطرح بوده و در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند التهاب، درد، آرتریت روماتوئید [۱۴] و آپوپتوز کبدی [۱۵] نقش دارد. کپسایسین به‌عنوان یک مولکول تند، مهم‌ترین ترکیب فعال فلفل قرمز

است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مصرف غذاهای حاوی کپسایسین با شیوع کمتر چاقی همراه است [۱۶]. مکانیزم بالقوه اثرات ضد چاقی کپسایسین شامل افزایش اکسیداسیون لیپیدها و مهار آدیپوژنز، افزایش و فعال کردن چربی قهوه‌ای و ترموژنز، سرکوب اشتها و افزایش سیری از طریق مسیرهای عصبی در هیپوتلاموس و تعدیل عملکرد دستگاه گوارش می‌باشد [۱۷]. علاوه بر این، نشان داده شده که کپسایسین AMPK را فعال کرده و مسیر Akt/mTOR که تنظیم کننده اصلی لیپوژنز کبدی است، را مهار می‌کند [۱۸]. با توجه به اختلال در عملکرد متابولیکی کبد به دنبال افزایش وزن و چاقی، به نظر می‌رسد فعالیت‌های بدنی و کپسایسین تاثیر مفیدی بر بهبود عملکرد کبد در نمونه‌های چاق دارد. با این وجود مکانیزم‌های سلولی فعالیت ورزشی و کپسایسین به خوبی شناسایی نشده است. همچنین بر اساس شواهد به نظر می‌رسد جهت کاهش چربی بدنی و بهبود عملکرد کبدی انواع ورزش‌های هوازی انتخاب مناسبی می‌باشد. لذا در این پژوهش سعی شده که به طور همزمان اثر محافظتی تمرین هوازی و کپسایسین بر بیان ژن AMPK و Akt بافت کبد در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب مورد بررسی قرار گیرد.

### روش کار

این پژوهش از نوع تجربی بوده و همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به سیاست‌های مربوط به حمایت از حیوانات (بر اساس خط مشی‌های قرارداد هلسینگی) انجام شد و قوانین راهنمای انستیتوی ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. همچنین این پژوهش با تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1398.015 به تصویب رسیده است. معیار انتخاب به مطالعه حاضر شامل نر بودن موش‌ها و قرار گرفتن در محدوده وزنی (شاخص لی

بالتر از ۳۱۰) مورد نظر بود. معیار خروج از مطالعه عدم اجرای پروتکل تمرینی و مصرف نکردن مکمل و آسیب حین اجرا تمرین بود. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر ۵ هفته‌ای با وزن  $9/41 \pm 147/68$  گرم از نژاد ویستار از انستیتو پاستور تهیه شد و به آزمایشگاه منتقل شدند. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی‌داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵٪ (خطای نوع دوم) ۸ سر در هر گروه تعیین شد. حیوانات مورد آزمایش در گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های پلی‌کربنات با تهویه مناسب نگهداری شدند. دمای محیط  $22 \pm 1/4$  درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت  $55/6 \pm 4$  درصد بود.

### روش القاء چاقی

بعد از سازگاری موش‌ها با شرایط محیطی جدید (پس از یک هفته)، موش‌ها به دو گروه رژیم غذایی نرمال (ND، n=۸) و رژیم غذایی پرچرب (HFD، n=۳۲) تقسیم شدند. موش‌های گروه ND به مدت هشت با غذایی استاندارد (۲۳ درصد پروتئین، ۶۵ درصد کربوهیدرات و ۱۲ درصد چربی) تغذیه شدند. در همین مدت موش‌های گروه HFD از رژیم غذایی پرچرب استفاده کردند. غذای پرچرب شامل ۱۷ درصد پروتئین، ۴۳ درصد کربوهیدرات و ۴۰ درصد چربی بود. برای تهیه غذای پرچرب ترکیبی از پودر غذای استاندارد موش‌های صحرایی (۳۶۵ گرم/کیلوگرم) چربی گوسفند، (۳۱۰ گرم/کیلوگرم)، کازئین (۲۵۰ گرم/کیلوگرم)، کلسترول (۱۰ گرم/کیلوگرم)، مخلوط ویتامین‌ها و مواد معدنی (۶۰ گرم/کیلوگرم)، DL متیونین (۳ گرم/کیلوگرم)، پودر مخمر (۱ گرم/کیلوگرم) و کلرید سدیم (۱ گرم/کیلوگرم) استفاده شد. ضمناً تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه موش دسترسی آزاد داشتند. بعد از هشت هفته همه موش‌ها به ۵ گروه: رژیم غذایی نرمال (ND)، پرچرب (HFD)، پرچرب-تمرین (HFDT)، پرچرب-کپسایسین (HFDCap) و

پرچرب-تمرین- کپسایسین (HFDTCap) تقسیم شدند. چاق شدن موش‌ها با شاخص لی (Lee Index) ارزیابی شد. موش‌های با مقادیر بالای ۳۱۰ بر اساس شاخص لی، چاق محسوب شدند.

### پروتکل تمرینی

قبل از شروع تمرین اصلی و به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل، موش‌ها در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰-۸ متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. برنامه فعالیت ورزشی هواری شامل دویدن روی تردمیل (شرکت تجهیز گستر امید ایرانیان، ساخت ایران) با شیب صفر درصد به مدت هشت هفته و پنج روز هفته بود. در هفته اول موش‌ها یک برنامه تمرینی هواری فزاینده را روی تردمیل با شدت ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام دادند. بعد از آن شدت فعالیت از ۱۵ متر در دقیقه به ۲۵ متر در

دقیقه در هفته هفتم رسیده و زمان فعالیت نیز به ۶۰ دقیقه افزایش یافت (جدول ۱). باتوجه به منبع استفاده شده، این شدت تمرین معادل ۶۰-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی ( $VO_{2max}$ ) در موش‌های چاق بود [۱۹]. هر جلسه تمرینی با پنج دقیقه گرم کردن در قالب راه رفتن با سرعت هفت متر بر دقیقه شروع شده و در نهایت با پنج دقیقه سردکردن به همین شیوه به اتمام می‌رسید. به منظور تحریک موش‌ها برای دویدن، از محرک صوتی (ضربه به دیواره نوارگردان)، استفاده شد؛ بدین صورت که در جلسات اول، از محرک الکتریکی با ولتاژ کم، همراه با محرک صوتی استفاده شد و پس از شرطی نمودن موش‌ها به همراه بودن دو محرک، در سایر جلسات به منظور رعایت نکات اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی، فقط از محرک صوتی استفاده شد.

جدول ۱. پروتکل تمرین (۱۹)

هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
۱۵ (متر)	۱۶	۱۸	۲۰	۲۱	۲۳	۲۵	۲۵
۳۰ (دقیقه)	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۶۰	۶۰

### نحوه تهیه و مصرف کپسایسین

کپسایسین (با خلوص ۹۵٪) از شرکت سیگما-آلدردیج (Sigma-Aldrich Co., LLC) خریداری شد. محلول کپسایسین ( $4 \text{ mg/ml}$ ) در سالین ۰/۹ درصد آماده شد. کپسایسین در سالین به خوبی حل نمی‌شود، اما سوسپانسیون به دست می‌آید. در تمام موارد قبل از استفاده از محلول برای اطمینان از این که ترکیبات در حالت معلق وجود دارد، به شدت مخلوط می‌شد. این ترکیب به صورت خوراکی با گاوآژ یک بار در روز با دوز  $4 \text{ mg/kg/day}$  به مدت هشت هفته در صبح پس از شروع چرخه روشنایی استفاده می‌شد [۲۰]. به دیگر گروه‌ها نیز به همان میزان سالین گاوآژ شد.

### روش بافت برداری و اندازه‌گیری متغیرها

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، به منظور از بین بردن اثرات حاد تمرین و مکمل) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین ( $60 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $5 \text{ mg/kg}$ ) بی‌هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی، وزن‌کشی و شست و شو با سالین فورا در تیوب‌های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای  $-80$  درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تأثیر ریتم شبانه‌روزی، نمونه‌گیری از ساعت ۸ آغاز شده و در ساعت  $11:30$  دقیقه به

طراحی شده توسط نرم افزار Allele IDv7.8 مربوط به ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی PCR q-RT انجام پذیرفت. توالی آغازگرها در جدول ۲ نشان داده شده است. برای کنترل داخلی از Beclin-1 استفاده شد. پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل: ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵° به مدت ۱۰ ثانیه و به دنبال آن ۴۵ سیکل ۱۰° ثانیه‌ای در حرارت ۶۰° بود. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (CT)<sup>۱</sup> مورد ارزیابی قرار گرفتند.

<sup>۱</sup> Thershold Cycle

پایان می‌رسید. برای بررسی بیان AMPK و Akt از روش Real Time PCR استفاده شد. جهت بررسی های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت کبد با استفاده از تیزول، انجام گرفت، سپس با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه زیر غلظت و درجه خلوص نمونه RNA به صورت کمی بدست آمد.

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A260 \times \epsilon \times d/1000$$

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بسیار بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای

جدول ۲. الگوی پرایمر AMPK و Akt

Genes	Sequence (5' → 3')
Beclin-1 forward	TTGCCAATAAGATGGGTCTGAA
Beclin-1 reverse	TGTCAGGGACTCCAGATACGAGTG
AMPK forward	ATCCGCAGAGAGATCCAGAA
AMPK reverse	CGTCGACTCTCCTTTTCGTC
Akt forward	AGGAGGAGGAGACGATGGAC
Akt reverse	AGGGCTGTAAGGAAGGGATG

### یافته‌ها

در جدول ۳ میانگین و نتایج آزمون بین گروهی مربوط به وزن گروه‌ها در هفته‌های مختلف ارائه شده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر القای HFD باعث کاهش معنی‌داری در میزان بیان AMPK ( $p=0/0001$ ) و افزایش معنی‌داری در بیان Akt ( $p=0/0001$ ) نسبت به گروه ND شد (جدول ۴).

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون، برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی بنفرونی استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-26 انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

جدول ۳. نتایج آمار توصیفی و استنباطی مربوط به وزن در گروه‌های مختلف پژوهش

p بین گروهی	گروه					وزن (گرم)
	HFDTCap	HFDCap	HFDT	HFD	ND	
۰/۳۹۴	۱۵۱/۲۲ ± ۸/۹۸	۱۴۸/۶۷ ± ۱۱/۱۹	۱۴۹/۱۱ ± ۶/۱۳	۱۴۳/۲۲ ± ۷/۲۵	۱۴۵/۳۳ ± ۱۱/۸۹	پیش‌آزمون
۰/۰۰۰۱*	# ۳۷۴/۸۹ ± ۲۶/۲۵	# ۳۶۲/۸۹ ± ۲۷/۱۲	# ۳۷۰/۵۶ ± ۳۶/۰۱	# ۳۳۹/۱۱ ± ۳۴/۴۶	۲۷۰/۱۱ ± ۲۳/۹۶	هفته چهارم
۰/۰۰۰۱*	# ۴۸۲/۲۲ ± ۵۰/۳	# ۴۸۲/۸۹ ± ۵۱/۶	# ۴۶۹/۵۶ ± ۳۷/۵	# ۴۵۶/۱۱ ± ۸۱/۸	۲۹۷/۵۶ ± ۳۰/۰۰	هفته هشتم
۰/۰۰۰۱*	#\$ ۴۲۵/۵۶ ± ۳۲/۷۸	# ۴۵۸/۷۸ ± ۴۳/۴۴	# ۴۵۴ ± ۳۵/۵۵	# ۴۷۳/۸۹ ± ۲۹/۲۶	۳۱۳/۸۹ ± ۳۰/۲۸	هفته چهارم بعد القای
۰/۰۰۰۱*	#\$ ۳۹۶/۶۷ ± ۳۲/۱	#\$ ۴۳۳/۶۷ ± ۴۰/۱	#\$ ۴۲۹/۷ ± ۳۲/۷	# ۴۷۹/۴۴ ± ۲۹/۳	۳۲۳/۵۶ ± ۳۲/۹۴	پس‌آزمون

نتایج آزمون t مستقل و واریانس یک‌راهه در سطح  $p \leq 0.05$ . \* تفاوت بین گروهی، # تفاوت با ND، \$ تفاوت با گروه HFDCap، ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFDT: رژیم غذایی پرچرب-تمرین، HFDCap: رژیم غذایی پرچرب-کپسایسین و HFDTCap: رژیم غذایی پرچرب-تمرین-کپسایسین.

جدول ۴. نتایج آزمون t مستقل در دو گروه ND و HFD

متغیر	گروه	میانگین	p-value	t
AMPK (بیان نسبی)	ND	۹/۹۲۸ ± ۰/۳۶۱	۰/۰۰۰۱*	۲۲/۲۱۴
	HFD	۱ ± ۰/۳۴۵		
Akt (بیان نسبی)	ND	۰/۲۷۷ ± ۰/۰۵۷	۰/۰۰۰۱*	-۶/۳۱۴
	HFD	۱ ± ۰/۳۱۸		

نتایج آزمون t مستقل در سطح  $p \leq 0.05$ . \* تفاوت بین گروهی، ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، AMPK: پروتئین کیناز فعال شده با AMP و Akt: پروتئین کیناز B.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو راهه نشان داد که تمرین ( $p = 0.032$ ) و کپسایسین ( $p = 0.045$ ) باعث افزایش معنی‌داری در بیان Akt بافت کبدی موش‌های صحرایی HFD شد. همچنین مداخله ترکیبی تمرین با کپسایسین بیان Akt سلول کبدی موش‌های HFD را کاهش داد ( $p = 0.0001$ ) (جدول ۵ و ۶).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو راهه نشان داد که تمرین ( $p = 0.032$ ) و کپسایسین ( $p = 0.045$ ) باعث افزایش معنی‌داری در بیان AMPK بافت کبدی موش‌های صحرایی HFD شد. همچنین مداخله ترکیبی تمرین با کپسایسین بیان AMPK سلول کبدی موش‌های HFD را افزایش داد ( $p = 0.017$ ) (جدول ۵ و ۶).

جدول ۵. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس دوراهه برای اثرات یک دوره تمرین و کپسایسین بر بیان ژن AMPK و Akt بافت کبد

متغیر	منبع	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	p-value	مجذور اتا (اندازه اثر)	توان
AMPK	تمرین	۹/۲۲۹	۱	۹/۲۲۹	۴/۹۷۵	۰/۰۳۲*	۰/۱۲۱	۰/۵۸۳
	کپسایسین	۷/۹۸۸	۱	۷/۹۸۸	۴/۳۰۶	۰/۰۴۵*	۰/۱۰۷	۰/۵۲۴
	تمرین × کپسایسین	۱۱/۶۰۴	۱	۱۱/۶۰۴	۶/۲۵۵	۰/۰۱۷*	۰/۱۴۸	۰/۶۸۲
	خطا	۶۶/۷۸۳	۳۶	۱/۸۵۵				
Akt	تمرین	۰/۳۴۸	۱	۰/۳۴۸	۴/۲۹۷	۰/۰۴۵*	۰/۱۰۷	۰/۵۲۳
	کپسایسین	۰/۳۳۴	۱	۰/۳۳۴	۴/۱۳۳	۰/۰۴۹*	۰/۱۰۳	۰/۵۰۷
	تمرین × کپسایسین	۱/۳۱۲	۱	۱/۳۱۲	۱۶/۲۱۰	۰/۰۰۰۱*	۰/۳۱۰	۰/۹۷۵
	خطا	۲/۹۱۳	۳۶	۰/۰۸۱				

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس دوراهه. \* تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$ . AMPK: پروتئین کیناز فعال شده با AMP و Akt: پروتئین کیناز B

جدول ۶. نتایج آزمون بونفرونی برای مقایسات دوگانه بیان ژن AMPK و Akt بافت کبد موش‌ها برای عامل تمرین و کپسایسین

متغیر	گروه های ۱	گروه های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
AMPK	عامل تمرین	بدون تمرین	۱/۰۰۵	۰/۴۵۰	۰/۰۳۲*
	عامل کپسایسین	بدون کپسایسین	۰/۹۳۵	۰/۴۵۰	۰/۰۴۵*
Akt	عامل تمرین	بدون تمرین	-۰/۱۹۵	۰/۰۹۴	۰/۰۴۵*
	عامل کپسایسین	بدون کپسایسین	-۰/۱۹۱	۰/۰۹۴	۰/۰۴۹*

نتایج آزمون بونفرونی. \* تفاوت در سطح  $p \leq 0.05$ 

AMPK: پروتئین کیناز فعال شده با AMP و Akt: پروتئین کیناز B

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای چاقی در موش‌ها با استفاده از HFD باعث کاهش بیان AMPK و افزایش معنی‌دار بیان Akt بافت کبدی شد. فعالیت ورزشی هوازی و مکمل کپسایسین بیان AMPK را افزایش داده و همچنین منجر به کاهش بیان Akt در بافت کبد موش‌های HFD شد. اثر تعامل تمرین و مکمل کپسایسین نیز نسبت به تمرین و مکمل معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد HFD می‌تواند بر متابولیسم تاثیر داشته و باعث اختلالات کبدی گردد. در این راستا، شانگ و همکاران نشان دادند که بیان AMPK در کبد تحت تاثیر رژیم HFD قرار گرفته و کاهش می‌یابد [۲۱]. همچنین ژانگ و همکاران نشان دادند که رژیم HFD باعث کاهش بیان پروتئین p-AMPK بافت کبد در موش‌ها می‌شود [۲۲]. کبد یک بافت حیاتی برای کنترل متابولیسم کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها بوده و نقش مهمی در پیشرفت دیابت نوع ۲، NAFLD و آترواسکروز دارد [۲۳]. AMPK تنظیم‌کننده اصلی هموستاز انرژی و متابولیسم مواد مغذی است. فعال‌سازی AMPK در کبد می‌تواند متابولیسم گلوکز و اکسیداتیو چربی را برای تامین انرژی بدن بهبود بخشد [۲۴]. چند مکانیسم احتمالی وجود دارد که کاهش AMPK به دنبال HFD را توضیح می‌دهد. ساده‌ترین توضیح این است، در زمانی که مقادیر کافی سوبسترای متابولیسمی مانند گلوکز و اسیدهای چرب آزاد در دسترس نمی‌باشد، فعالیت AMPK افزایش می‌یابد. بنابراین ممکن است عکس این موضوع هم صادق باشد، زیرا به دنبال HFD

سوبسترای بیشتری در دسترس بوده و باعث کاهش فعالیت AMPK می‌شود [۲۵]. علاوه بر این از آنجایی که یکی دیگر از تنظیم‌کننده‌های فعالیت AMPK نسبت ATP/AMP است، این احتمال وجود دارد که HFD با افزایش این نسبت، فعالیت AMPK را مهار کند. در این خصوص ارزیابی کاهش AMPK از طریق القای HFD دشوار می‌باشد، برای اینکه اطلاعات کمی درباره چگونگی تاثیر HFD بر شاخص‌های انرژی درون سلولی از قبیل  $^1\text{ATP}$ ،  $^2\text{AMP}$ ،  $^3\text{PCr}$  و  $\text{Pi}$  وجود دارد. یکی دیگر از دلایل احتمالی کاهش فعالیت AMPK، ممکن است ناشی از تغییرات لپتین باشد. نشان داده شده که مقاومت لپتینی که به دنبال HFD رخ می‌دهد منجر به اختلال در سیگنال‌دهی لپتین درون سلولی شده و منجر به کاهش فعال‌شدن AMPK می‌شود [۲۶]. از دیگر نتایج پژوهش حاضر افزایش معنی‌دار بیان Akt بافت کبدی به دنبال القای HFD بود. لیو و همکاران نیز نشان دادند که سطح پایه فسفوریلاسیون Akt در کبد و عضله گاستروکنمیوس موش تحت رژیم HFD قرار می‌گیرد [۲۷]. هنگامی که تجمع چربی در بافت چربی و دیگر بافت‌ها افزایش یابد، چربی‌ها و آدیپوکین‌ها ممکن است مقاومت به انسولین و هیپرانسولینمی را از طریق mTOR<sup>۴</sup> القاء کرده که منجر به افزایش سیگنال‌دهی انسولین وابسته به Akt می‌شود. در این

<sup>1</sup> Adenosine Triphosphate

<sup>2</sup> Adenosine Monophosphate

<sup>3</sup> Phosphocreatine

<sup>4</sup> Mammalian Target of Rapamycin



و التهاب کبد مرتبط بوده [۷] و به نظر می‌تواند در درمان آسیب‌های ناشی از چاقی بر این بافت تاثیر داشته باشد. با این وجود تا که گوشی و همکاران نشان دادند که سطح AMPK mRNA در موش‌های دیابتی نوع ۲ به دنبال ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی با شدت پایین تغییر نکرد [۳۰].

از دیگر نتایج پژوهش حاضر کاهش معنی‌دار بیان Akt بافت کبدی به دنبال فعالیت ورزشی بود. Akt تنظیم‌کننده کلیدی سیگنال‌دهی انسولین کبدی است که به عنوان پروتئین کیناز B (PKB) نیز شناخته می‌شود [۳۱]. فعال‌سازی Akt واسطه اثرات مهارتی انسولین بر گلوکونئوژنز، گلیکوژنولیز و همچنین اکسیداسیون اسیدهای چرب کبدی است [۳۲]. استرس اکسیداتیو و متابولیسم ناشی از استئاتوهپاتیت، سیگنال‌دهی Akt را از حالت تنظیم خارج کرده و مقاومت به انسولین کبدی را افزایش می‌دهد. مطالعات قبلی نشان داده که تمرین شنا می‌تواند این اثرات مخرب ناشی از برهم خوردن سیگنالینگ Akt را بهبود ببخشد [۳۳]. همچنین در پژوهش دیگری روی موش‌های چاق نشان داده شده که دویدن داوطلبانه با بهبود عملکرد Akt و سیگنال‌دهی انسولین در سطح سلوها همراه است [۹]. محققان نشان دادند که فعالیت ورزشی ممکن است باعث کاهش مقاومت به انسولین از طریق کاهش ROS<sup>۲</sup> ناشی از Nox4<sup>۳</sup> در عضله اسکلتی و افزایش انتقال سیگنال Akt شود. همچنین فعالیت ورزشی می‌تواند بیان TRB3<sup>۴</sup> را کاهش داده و فسفوریلاسیون Akt را در عضله اسکلتی حیوانات چاق بازیابی کند. این پروتئین مکانیسم دیگری است که فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق آن فسفوریلاسیون Akt را بهبود دهد [۳۴]. اگرچه مطالعه حاضر بیان TRB3 را تجزیه و تحلیل نکرده است، این احتمال وجود دارد که پروتکل تمرین هوازی

شرایط سیگنال‌های وابسته به Akt فعال شده تا گلوکز را در سطح طبیعی خود نگه دارند [۲۷].

AMPK به عنوان یک پروتئین هتروتریمریک (با زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$ ) یکی از حسگرهای انرژی سلولی اصلی است که تحت استرس متابولیکی، مانند ناشتایی و فعالیت ورزشی، از طریق فسفوریلاسیون ترئونین ۱۷۲ فعال شده، و باعث افزایش جذب گلوکز و اکسیداسیون چربی‌ها می‌شود [۷]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان AMPK بافت کبدی در گروه HFD نسبت به گروه HFD افزایش معنی‌داری داشت. پیل اکی و همکاران در پژوهش نشان دادند که فعالیت ورزشی روی نوارگردان به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته به مدت ۴۰ دقیقه، کاهش بیان AMPK کبدی ناشی از HFD را معکوس کرده و همچنین باعث بهبود تحمل گلوکز و کاهش چربی کبد شد [۱۰]. دنیز و همکاران نیز نشان دادند که هشت هفته تمرین هوازی در موش‌های HFD باعث افزایش معنی‌دار در بیان کبدی AMPK شده و همچنین التهاب و مقاومت به انسولین را در این موش‌ها کاهش می‌دهد [۲۸]. همچنین جازسوزاک و همکاران بیان کردند که هشت هفته تمرین استقامتی باعث افزایش بیان AMPK بافت کلیوی در موش‌های HFD می‌شود [۲۹]. در کبد، تمرین استقامتی فعالیت AMPK را افزایش داده و منجر به بهبود عملکرد میتوکندری شده و در نهایت منجر به کاهش لیپوژنز و افزایش اکسیداسیون چربی‌ها می‌شود. فعال‌سازی AMPK کبدی همچنین باعث القای اتوفازی از طریق فسفوریلاسیون ULK-1<sup>۱</sup> شده، چربی‌های اضافی توسط لیزوزوم‌ها حذف و منجر به کاهش تجمع چربی اضافی در کبد می‌شود [۲۹]. در عضلات اسکلتی نیز نشان داده شده که تمرین هوازی باعث افزایش بیان AMPK می‌شود [۳۰]. در کبد، فعال شدن AMPK با بهبود متابولیسم

<sup>۲</sup> Reactive Oxygen Species

<sup>۳</sup> NADPH Oxidase 4

<sup>۴</sup> Tribbles Homolog 3

<sup>۱</sup> Unc-51-like Kinase 1

در مطالعه ما با کاهش بیان TRB3 همراه بوده و متعاقبا بیان Akt پس از فعالیت ورزشی بهبود یافت. با این وجود معینی و همکاران در پژوهشی نشان دادند که تمرین تناوبی با شدت بالا باعث افزایش معنی‌دار در بیان ژن Akt بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌شود [۳۵]. تفاوت در نمونه‌ها (چاق در برابر دیابتی)، نوع تمرین (هوازی در مقابل تناوبی با شدت بالا) و بافت مورد بررسی (کبد در برابر قلب) ممکن است باعث نتایج متفاوت شده است. در پژوهش حاضر افزایش AMPK با کاهش Akt همراه بود. گائو و همکاران نیز نشان دادند که مداخله فعالیت ورزشی و رژیم غذایی با هم باعث فعال‌سازی مسیر AMPK/ULK1 و همچنین سرکوب مسیر Akt/mTOR/ULK1 در بافت کبدی شده و به‌عنوان یک استراتژی موثر برای بهبود اختلالات کبدی می‌باشد [۳۶]. با این وجود در همین پژوهش نشان داده شد که فعالیت ورزشی تأثیری بر بیان Akt در عضلات اسکلتی ندارد.

نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده افزایش بیان AMPK و کاهش Akt به دنبال مصرف کپسایسین بود. در این راستا بروت و همکاران در پژوهشی نشان دادند که کپسایسین AMPK را در سلول‌های کبدی فعال کرده و مسیر Akt/mTOR که تنظیم‌کننده اصلی لیپوژنز کبدی است، را مهار کرد. در این پژوهش نشان داده شد که فعال‌سازی AMPK ناشی از کپسایسین منجر به مهار AKT/mTOR و SREBP-1c<sup>۱</sup> شده، و ممکن است مکانیزمی باشد که توسط آن کپسایسین لیپوژنز را مهار می‌کند [۱۸]. نشان داده شده که AMPK فعال‌شده با کپسایسین، ACC<sup>۲</sup> را مهار می‌کند. این آنزیم مالونیل-CoA را از اسیدهای چرب سنتز کرده و SREBP-1c، که یک فاکتور کنترل‌کننده رونویسی بیان ژن‌های لیپوژنیک

مانند FAS<sup>۳</sup> و ACC است را کنترل کرده و منجر به مهار لیپوژنز می‌شود. کپسایسین همچنین Akt و mTORC1 را مهار می‌کند که با تنظیم SREBP-1c باعث تنظیم لیپوژنز می‌شود [۵]. توانایی کپسایسین برای مهار ACC و SREBP-1c یکی از مزیت‌های این ماده برای مقابله با استئاتوز کبدی و هیپرتری‌گلیسیریدمی کبد است. همچنین کیم و همکاران نشان دادند که کپسایسین با فعال کردن FOXO1<sup>۴</sup> و AMPK در سلول‌های کبدی، باعث سرکوب گلیکوژنوژنز کبدی شده و به بهبود قند خون کمک می‌کند [۹]. از دیگر نتایج پژوهش حاضر افزایش معنی‌دار AMPK و کاهش Akt در گروه HFDTCap نسبت به گروه‌های دیگر بود. به نظر ترکیب تمرین و مکمل با هم باعث اثر هم‌افزایی شده و این نتایج را به همراه داشته است. در محدود پژوهشی که به بررسی اثر هم‌زمان تمرین ورزشی و کپسایسین پرداختند نشان داده شد که ترکیب این دو باعث افزایش p-AMPK عضلانی در موش‌های تغذیه شده با فروکتوز بالا شد. همچنین مقاومت به انسولین، استرس اکسیداتیو و اندازه جزایر پانکراس کاهش یافت [۳۵]. همچنین دی-لوردیس و همکاران در پژوهشی نشان دادند که ترکیب تمرین و کپسایسین باعث کاهش کالری دریافتی، وزن بدن، درصد چربی شکمی، استرس اکسیداتیو و استئاتوز کبدی می‌شود [۳۷]. از نقاط قوت پژوهش حاضر می‌توان به نوع تمرین اشاره کرد. از آنجایی که انجام تمرین با شدت کم یا متوسط به مدت طولانی نسبت به تمرینات با شدت بالا و یا تمرینات مقاومتی برای نمونه‌ها و یا افراد چاق راحت‌تر بوده و در کاهش چربی‌های بدن اثر بیشتری دارد، لذا این روش تمرینی در نمونه‌های چاق توصیه می‌گردد.

از محدودیت پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری بیان SREBP-1c و TRB3 به خاطر محدودیت‌های مالی

<sup>1</sup> Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c

<sup>2</sup> Acetyl-CoA Carboxylase

<sup>3</sup> Fatty Acid Synthase

<sup>4</sup> Forkhead Box Protein O1

استراتژی جالب موثر برای بهبود عملکرد کبدی در رژیم غذایی با چربی بالا می‌باشد. مطالعات انسانی برای بررسی اثر کپسایسین و فعالیت ورزشی بر این مسیر ضروری به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی و با تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1398.015 انجام شده است. بدین وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحدهای دانشگاهی اعلام می‌دارند.

### تعارض منافع

در این پژوهش هیچ گونه تضاد منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

بود. اندازه‌گیری این شاخص‌ها می‌توانست درک دقیق‌تری از تاثیر تمرین و کپسایسین بر عوامل موثر بر سیگنال‌های موثر بر لیپوژنز کبدی داشته باشد. از آنجای که چاق شدن یک روند طولانی بوده و این بیماری در دراز مدت اثرات خود را بر جای می‌گذارد، لذا مدت زمان انجام این پروتکل نیز از محدودیت‌های دیگر پژوهش حاضر بود.

### نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان می‌دهد که رژیم غذایی پرچرب در موش‌های صحرایی باعث افزایش نشانگرهای لیپوژنز کبدی شده و نقش بالقوه مهمی در پیشرفت آسیب کبدی دارد. درمان با تمرین و کپسایسین نشانگرهای لیپوژنز کبدی را در موش‌های صحرایی HFD بهبود می‌بخشد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعامل تمرین و کپسایسین اثر بیشتری بر نشانگرهای لیپوژنز کبدی نسبت به هر کدام به تنهایی داشته است. بنابراین ترکیب تمرین و کپسایسین یک

### References

- 1- Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. 2019 Mar;92:6-10.
- 2- Grundy SM. Metabolic complications of obesity. *Endocrine*. 2000 Oct;13(2):155-65.
- 3- Wang Z, Yao T, Pini M, Zhou Z, Fantuzzi G, Song Z. Betaine improved adipose tissue function in mice fed a high-fat diet: a mechanism for hepatoprotective effect of betaine in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 May; 298(5): 634-42.
- 4- Kurauti MA, Costa-Júnior JM, Ferreira SM, Dos Santos GJ, Protzek AO, Nardelli TR, et al. Acute exercise restores insulin clearance in diet-induced obese mice. *J Endocrinol*. 2016 Jun; 229(3):221-32.
- 5- Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab*. 2011 Jul;14(1):21-32.
- 6- Zhao Y, Hu X, Liu Y, Dong S, Wen Z, He W, et al. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol Cancer*. 2017 Apr; 16:79.
- 7- Steinberg GR, Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jul; 18(7):527-551.
- 8- Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017 Oct; 67(4):829-46.
- 9- Kim HK, Jeong J, Kang EY, Go G. Red Pepper (*Capsicum annum* L.) Seed extract improves glycemic control by inhibiting hepatic gluconeogenesis via phosphorylation of FOXO1 and AMPK in obese diabetic db/db mice. *Nutrients*. 2020 Aug;12(9):2546.
- 10- Ok DP, Ko K, Bae JY. Exercise without dietary changes alleviates nonalcoholic fatty liver disease without weight loss benefits. *Lipids Health Dis*. 2018 Sep;17(1):1-7.

- 11- Shykhoslemlami Z, Abdi A, Hosseini SA, Barari A. Effect of continuous aerobic training with citrus aurantium L. on mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinases gene expression in the liver tissue of the elderly rats. *J Ilam Uni Med Sci*. 2022 Feb;29(6):81-9. [Full text in Persian]
- 12- Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015 Aug;149(2):367-78.
- 13- Upchurch DM, Chyu L. Use of complementary and alternative medicine among American women. *Women's Health Issues*. 2005 Jan-Feb;15(1):5-13.
- 14- Richards BL, Whittle SL, Buchbinder R. Neuromodulators for pain management in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jan;1(1):CD008921.
- 15- Li Q, Li L, Wang F, Chen J, Zhao Y, Wang P, et al. Dietary capsaicin prevents nonalcoholic fatty liver disease through transient receptor potential vanilloid 1-mediated peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  activation. *Pflugers Arch*. 2013 Sep;465(9):1303-16.
- 16- Wahlqvist ML, Wattanapenpaiboon N. Hot foods—unexpected help with energy balance? *Lancet*. 2001 Aug;358(9279):348-359.
- 17- Zheng J, Zheng S, Feng Q, Zhang Q, Xiao X. Dietary capsaicin and its anti-obesity potency: from mechanism to clinical implications. *Biosci Rep*. 2017 May;37(3):BSR20170286.
- 18- Bort A, Sánchez BG, Mateos-Gómez PA, Díaz-Laviada I, Rodríguez-Henche N. Capsaicin targets lipogenesis in HepG2 cells through AMPK activation, AKT inhibition and PPARs regulation. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr;20(7):1660.
- 19- Rocha-Rodrigues S, Rodríguez A, Gouveia AM, Gonçalves IO, Becerril S, Ramírez B, et al. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life sci*. 2016 Nov;165:100-8.
- 20- Mosqueda-Solís A, Sánchez J, Portillo MP, Palou A, Picó C. Combination of capsaicin and hesperidin reduces the effectiveness of each compound to decrease the adipocyte size and to induce browning features in adipose tissue of western diet fed rats. *J Agric Food Chem*. 2018 Sep;66(37):9679-89.
- 21- Sheng D, Zhao S, Gao L, Zheng H, Liu W, Hou J, et al. BabaoDan attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via activation of AMPK signaling. *Cell biosci*. 2019 Sep;9:77.
- 22- Zhang Y, Deng Y, Tang K, Chen R, Liang S, Liang Y, et al. Berberine ameliorates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats via activation of SIRT3/AMPK/ACC pathway. *Curr med sci*. 2019 Feb;39(1):37-43.
- 23- Day EA, Ford RJ, Steinberg GR. AMPK as a therapeutic target for treating metabolic diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 Aug;28(8):545-560.
- 24- Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab*. 2009 May;9(5):407-16.
- 25- Saha AK, Xu XJ, Lawson E, Deoliveira R, Brandon AE, Kraegen EW, et al. Downregulation of AMPK accompanies leucine-and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes*. 2010 Oct;59(10):2426-34.
- 26- Lindholm CR, Ertel RL, Bauwens JD, Schmuck EG, Mulligan JD, Saupe KW. A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats. *J Physiol Biochem*. 2013 Jun;69(2):165-75.
- 27- Liu HY, Hong T, Wen GB, Han J, Zuo D, Liu Z, et al. Increased basal level of Akt-dependent insulin signaling may be responsible for the development of insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Oct;297(4): 898-906.
- 28- Alnaqeeb M, Thomson M, Bordia T, Ali M. Histopathological effects of garlic on liver and lung of rats. *Toxicol Lett*. 1996 Jun;85(3):157-64.
- 29- Takahashi H, Kotani K, Tanaka K, Egucih Y, Anzai K. Therapeutic approaches to nonalcoholic fatty liver disease: exercise intervention and related mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Oct;9:588.

- 30- Takekoshi K, Fukuhara M, Quin Z, Nissato S, Isobe K, Kawakami Y, et al. Long-term exercise stimulates adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and subunit expression in rat visceral adipose tissue and liver. *Metabolism*. 2006 Aug;55(8):1122-28.
- 31- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw E, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB $\beta$ ). *Science*. 2001 Jun;292(5522):1728-31.
- 32- Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum M. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 $\alpha$  transcription coactivator. *Nature*. 2007 Jun;447(7147):1012-16.
- 33- Zhang Y, Wan J, Liu S, Hua T, Sun Q. Exercise induced improvements in insulin sensitivity are concurrent with reduced NFE2/miR-432-5p and increased FAM3A. *Life Sci*. 2018 Aug;207:23-29.
- 34- Qi J, Luo X, Ma Z, Zhang B, Li S, Duan X, et al. Swimming exercise protects against insulin resistance via regulating oxidative stress through Nox4 and AKT signaling in high-fat diet-fed mice. *J Diabetes Res*. 2020 Jan;2020:2521590.
- 35- Medina-Contreras J, Colado-Velázquez J, Gómez-Viquez N, Mailloux-Salinas P, Pérez-Torres I, Aranda-Fraustro A, et al. Effects of topical capsaicin combined with moderate exercise on insulin resistance, body weight and oxidative stress in hypoestrogenic obese rats. *Int J Obes*. 2017 May;41(5):750-758.
- 36- Gao Y, Zhang W, Zeng LQ, Bai H, Li J, Zhou J, et al. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy. *Redox Biol*. 2020 Sep;36:101635.
- 37- Medina-Contreras J, Mailloux-Salinas P, Colado-Velazquez J, Gómez-Viquez N, Velázquez-Espejel R, Susunaga-Notario A, et al. Topical capsaicin cream with moderate exercise protects against hepatic steatosis, dyslipidemia and increased blood pressure in hypoestrogenic obese rats. *J Sci Food Agric*. 2020 May;100(7):3212-3219.