

The effect of hypoxia and normoxia training on autophagy in male rats hepatocytes with a high-fat diet

Seyed Morteza Hosseini¹, Hamid Mohebbi^{2*}, Hossein Ghafoori³, Mohammad Hosseine Rezadoost⁴

Receive 2023 May 27; Accepted 2023 August 13

Abstract

Aim: Degradation of autophagy is associated with hepatic fat accumulation. Although the increase in autophagy flux through diet, exercise, and hypoxia effectively improves the fatty liver, its molecular mechanisms are unknown. This study aimed to investigate the effect of nutrition and exercise on hypoxia and normoxia on liver autophagy. **Methods:** Twenty-four male Wistar rats (weight=165±9 grams) were randomly divided into the normal diet (ND), high-fat diet (HFD), high-fat diet+ normoxia exercise (HFD+NE), and high-fat diet+ hypoxia exercise (HFD+HE). The exercise was performed in three weekly sessions for 12 weeks at 68 to 80 percent of maximal aerobic velocity in normoxia (high about 50 meters) and hypoxic-hypobaric (high about 3000 meters). In the end, tissue samples were collected to measure the liver fat content and *Atg5* and *Ulk1* gene expression changes. Data were analyzed using ANOVA tests ($p<0.05$). **Results:** Compared to the ND group, liver fat increased in the HFD group, and the expression of *Atg5* and *Ulk1* decreased ($p<0.05$). The increased liver fat in the training groups was lower than in the HFD group ($p<0.05$). Although exercise reduces decreasing expression of *Atg5* caused by the high-fat diet, it was not significant. *Ulk1* was higher in the HFD+HE group than in all groups ($p<0.05$). **Conclusions:** The regulation of autophagy genes by exercise is probably an effective mechanism in preventing liver fat accumulation. Although hypoxia training had a more significant effect on the autophagy genes, it had not an additional effect on reducing liver fat content.

Keywords: Fatty Liver, Diet, Autophagy, Hypoxia, Exercise.



Scan this QR code to see the accompanying video, or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

1. PhD Student of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. ***(corresponding author)**
(E mail:Mohebbi@guilan.ac.ir)
3. Associate Professor of Biochemistry, Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Assistant Professor of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Cite as: Hosseini, Seyed Morteza. Mohebbi, Hamid. Ghafoori, Hossein. Rezadoost, Mohammad Hosseine. The effect of hypoxia and normoxia training on autophagy in male rats hepatocytes with a high-fat diet. 2024; 11(1): 39-52.

Owner and Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

Journal ISSN (online): 2676-6507

Access Type: Open Access

DOI: 10.22049/JAHSSP.2023.28682.1559

DOR:



Extended abstract

Background

Adaptation to exercise depends largely on the type and nature of the exercise. Endurance training is a physical activity. When the liver is exposed to large amounts of fat, it starts absorbing fat to clear FFAs from the blood and placing them in a compartment to prevent lipotoxicity. Until recently, the breakdown of lipid droplets was exclusively attributed to lipolytic enzymes, but now the role of lysosome-dependent autophagy has been noticed as one of the effective metabolic mechanisms. As one of the mechanisms formed in eukaryotic cells to deal with starvation and remove damaged parts of the cell, autophagy decreases with extra calories and fat accumulation. Although the increase in autophagy flux through diet, exercise, and hypoxia effectively improves the fatty liver, its molecular mechanisms are unknown. This study aimed to investigate the effect of nutrition and exercise in hypoxia and normoxia on liver autophagy.

Methodology

Twenty-four male Wistar rats (weight=165±9 grams), after one week of adaptation to environmental conditions, were randomly divided into the normal diet (ND) (10 percent kcal fat, 70 percent kcal carbohydrates, 20 percent kcal protein), high-fat diet (HFD) (60 percent kcal fat, 20 percent kcal carbohydrates, 20 percent kcal protein), high-fat diet+ normoxia exercise (HFD+NE), and high-fat diet+ hypoxia exercise (HFD+HE). After the animals were acclimated to the treadmill, a maximal aerobic velocity (MAV) test was evaluated to manage the training intensities for the following 12 weeks precisely. The exercise protocol was incremental without incline and was performed thrice a week for 12 weeks. The first week of training started with an intensity equal to 68 percent of MAV obtained in hypoxia and normoxia, and it was maintained until the third week. In the third week, the intensity reached 75 percent of MAV, and in the fifth week, to 80 percent of MAV, and after that, the training time increased until the end of the ninth week. To maintain the appropriate intensity of training, at the end of the fourth and eighth weeks, the maximal aerobic velocity test was performed again. A hypoxic chamber and two vacuum pumps created a normobaric hypoxia condition (14% O₂, altitudes of about 3000 meters). A normoxic condition was created with room air (20/9% O₂) at 50 meters above sea level in Rasht City. Soda Lime and silica gel chemical adsorbents were used to maintain the CO₂ and humidity levels inside the chamber. In the end, tissue samples were collected to measure changes in *Ulk1* and *Atg5* genes expression. Gene expression was measured using a real-time PCR method, and data were analyzed using ANOVA tests at a significance level of $p < 0/05$.

Results

The data analysis shows that the rats' weight increased in all groups. Compared to the ND group, the high-fat diet significantly increased the weight in the HFD, HFD+NE and HFD+HE groups. The weight of rats in the HFD+NE and HFD+HE groups was significantly lower than the HFD group ($p < 0/01$). The increase in HFD+NE and HFD+HE groups was $13\% \pm 0/09$ and $16\% \pm 0/09$, respectively. The weight of the rats in the HFD+NE and HFD+HE groups was significantly lower than the HFD group ($p < 0/01$). Based on the results of quantification with the Oil Red Oil Stain method, it was found that the fat content of the liver of rats in the high-fat diet group increased by $10/64 \pm 1/33$ times compared to the normal diet group ($p < 0/001$). Meanwhile, the liver fat content in the HFD group was significantly higher than in the HFD+NE and HFD+HE groups ($p < 0/05$). The fat content of the liver of rats in the HFD+NE and HFD+HE groups is lower than in the HFD group ($p < 0/05$). Although exercise caused the liver fat content of rats in the HFD+NE and HFD+HE groups to decrease compared to the HFD group, it could not make a significant difference from the ND group. There was no significant difference between HFD+NE and HFD+HE groups in reducing liver fat content ($p = 0/99$). High-fat diet decreased the *Atg5* gene fold by $0/42 \pm 0/02$ in the HFD group compared to the ND group ($p < 0/05$). This decrease in HFD+NE and HFD+HE groups was $0/72 \pm 0/18$ and 0.7 ± 0.08 , respectively ($p < 0/05$). HFD was observed compared to the ND group ($P < 0/001$). Exercise intervention increased *Ulk1* levels. In HFD+NE and HFD+HE groups, *Ulk1* expression level was $1/04 \pm 0/02$ and $1/71 \pm 0/18$, respectively. This increase in the HFD+HE group was significant ($p < 0/05$). The difference in the HFD+NE group compared to the HFD+HE group was also significant ($p < 0/05$).

Conclusion

The results of the present study, using biochemical and histological measurements, confirmed the results of previous studies and showed that fatty liver could be induced with a high-fat diet without consuming toxins or diets lacking nutrients. High-fat diet probably reduces autophagy by decreasing the expression of *Ulk1* and *Atg5* genes. The abnormal fatty acid metabolism caused by obesity, which occurs in the liver tissue, is one of the influential factors in nonalcoholic fatty liver disease. Although we observed a decrease in the gene expression of autophagy genes in the liver of rats fed a high-fat diet, the cause of this defect and the mechanisms leading to the reduction of *Atg5* and *Ulk1* are unclear. Since obesity is associated with increased fat accumulation in the liver, chronic lipid overload or persistent lipogenesis may be one of the drivers of autophagy defects. It is possible that a high-fat diet activates *Mtor* and thereby suppresses *Atg5* and



Ulk1 genes. Considering the higher activity of the *Ulk1* gene in the HFD+HE group and the reduction of liver fat accumulation in the conditions of lower energy consumption during exercise compared to the HFD+NE group, probably the hypoxia exercise through the induction of autophagy in improving the symptoms of fatty liver plays a pivotal role. Although hypoxia training had a more significant effect on the autophagy genes, it had not an additional effect on reducing liver fat content.

Article message: This research shows that a high-fat diet decreases the levels of genes involved in the autophagy process (*Ulk1* and *Atg5*) and increases the storage of LDs in the liver. The activation of autophagy flow through the reduction of liver blood flow during exercise is one of the possible mechanisms to reduce the symptoms of fatty liver. In the HFD+HE group, the decrease in the oxygen percentage of the environment and the reduction of the blood flow of the liver tissue may have a double effect on the induction of liver autophagy.

مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال یازدهم، شماره اول؛

بهار و تابستان ۱۴۰۳؛ صفحات ۳۹-۵۲

Open Access

مقاله پژوهشی

اثر تمرین هیپوکسی و نرم اکسی بر اتوفازی سلول‌های کبد رت‌های نر دارای رژیم غذایی پرچرب

سید مرتضی حسینی^۱، حمید محبی^{۲*}، حسین غفوری^۳، محمد حسین رضادوست^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۲

چکیده

هدف: تخریب اتوفازی با تجمع چربی کبدی همراه است. اگرچه افزایش جریان اتوفازی به‌واسطه رژیم غذایی، ورزش و هیپوکسی در بهبود علائم کبد چرب مؤثر هستند، اما مکانیسم‌های مولکولی آن ناشناخته‌اند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر تغذیه و تمرین در شرایط هیپوکسی و نرم اکسی بر اتوفازی کبد بود. روش **شناسی:** ۲۴ سر رت نر ویستار با میانگین وزن 165 ± 9 گرم به‌طور تصادفی به گروه رژیم غذایی طبیعی (ND)، رژیم غذایی پرچرب (HFD)، رژیم غذایی پرچرب و تمرین نرم اکسی (HFD+NE) و رژیم غذایی پرچرب و تمرین هیپوکسی (HFD+HE) تقسیم شدند. تمرینات با شدت ۶۸ تا ۸۰ درصد حداکثر سرعت هوازی در شرایط نرم اکسی (ارتفاع حدود ۵۰ متر) و هیپوکسی-هیپوباریک (ارتفاع حدود ۳۰۰۰ متر)، به مدت ۱۲ هفته و ۳ جلسه در هفته اجرا شدند. در پایان، نمونه‌های بافتی برای اندازه‌گیری تغییرات بیان *Ulk1* و *Atg5* و محتوای چربی کبد جمع‌آوری شدند. تحلیل داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک راهه در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ انجام شد. **یافته‌ها:** مقادیر چربی کبد در گروه HFD نسبت به گروه ND افزایش و بیان *Ulk1* و *Atg5* کاهش داشت ($p < 0.05$). میزان افزایش چربی کبد در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه HFD کمتر بود ($p < 0.05$). اگرچه تمرین از کاهش بیان *Atg5* ناشی از رژیم غذایی پرچرب تا حدودی جلوگیری کرده بود، اما به لحاظ آماری در سطح معنی‌داری نبود. *Ulk1* در گروه HFD+HE از تمامی گروه‌ها بالاتر بود ($p < 0.05$). **نتیجه‌گیری:** احتمالاً تنظیم ژن‌های اتوفازی به‌واسطه تمرین می‌تواند مکانیسم مؤثری از جلوگیری از تجمع چربی کبدی محسوب شود. هرچند تمرین در هیپوکسی بر بیان ژن‌های اتوفازی اثر بیشتری داشت اما تأثیر مازادی بر کاهش محتوای چربی کبدی نداشت.

واژه‌های کلیدی: کبد چرب، رژیم غذایی، اتوفازی، هیپوکسی، تمرین. کبد چرب، رژیم غذایی، اتوفازی، هیپوکسی، تمرین.



با اسکن QR فوق می‌توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت www.jahssp.azaruniv.ac.ir/ مشاهده کنید

۱. دانشجوی دوره دکترا، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. استاد، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. (نویسنده مسئول): Mohebbi@guilan.ac.ir
۳. دانشیار، بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۴. استادیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

نحوه ارجاع: حسینی، سید مرتضی، محبی، حمید، غفوری، حسین، رضا دوست، محمد حسین. "اثر تمرین هیپوکسی و نرم اکسی بر اتوفازی سلول‌های کبد رت‌های نر دارای رژیم غذایی پرچرب". مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش. ۱۴۰۳؛ ۱۱ (۱): ۳۹-۵۲.

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

شاپای الکترونیکی: ۶۵۰۷-۲۶۷۶

نوع دسترسی: آزاد

DOI: 10.22049/JAHSSP.2023.28682.1559

DOR: 20.1001.



مقدمه

کاهش فعالیت‌های روزمره و زندگی غیرفعال در ترکیب با رژیم غذایی پرچرب تهدیدی برای تندرستی افراد به‌شمار می‌روند. این عوامل می‌توانند سبب بروز اضافه‌وزن و چاقی در کودکان و بزرگسالان شوند. افزایش نرخ چاقی و مصرف روزافزون غذاهای پرچرب در جوامع مختلف، سبب شده تا بررسی اثرات رژیم غذایی پرچرب موردعلاقه پژوهشگران قرار گیرد. از آنجایی که این رژیم در جوندگان، مشکلات متابولیکی که در افراد چاق مشاهده می‌شود را بازسازی می‌کند (۱)، امروزه پژوهش‌های زیادی تأثیر رژیم غذایی پرچرب بر فیزیولوژی بافت‌های مختلف از جمله کبد را مورد - بررسی قرار می‌دهند. پژوهشگران دریافتند چاقی مرکزی و تغییر ترشح هورمون‌ها به همراه تجمع چربی در بافت‌های متابولیکی مختلف مانند کبد، عضلات و پانکراس زمینه‌ساز بروز سندرم متابولیکی می‌شود (۲).

بیماری کبد چرب غیر الکلی^۱ (NAFLD) یکی از بیماری‌های مرتبط با سندرم متابولیک محسوب می‌شود. افزایش شیوع NAFLD در بین جمعیت‌های مختلف، افزایش هزینه مراقبت‌های بهداشتی و کاهش کیفیت زندگی مرتبط با NAFLD را به‌دنبال دارد. NAFLD یکی از رایج‌ترین بیماری‌های کبدی در کودکان و بزرگسالان محسوب می‌شود که میانگین شیوع آن در جوامع مختلف حدود ۲۵ درصد گزارش شده است (۳).

مصرف مداوم غذاهای پرچرب منجر به چاقی، افزایش تری‌گلیسیرید و اختلال در متابولیسم کبد می‌شود (۴). زمانی که کبد در مواجهه با مقادیر زیاد چربی قرار می‌گیرد شروع به جذب و تشکیل قطرات چربی^۲ (LDs) می‌کند (۵). در طول گرسنگی مقداری از این ذخایر، متابولیزه شده و به حفظ عملکرد سلول کمک می‌کند. تا همین اواخر شکسته شدن LDs منحصراً به آنزیم‌های لیپولیزی نسبت داده می‌شد اما اکنون نقش اتوفاژی^۳ وابسته به لیروزم به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مؤثر متابولیکی موردتوجه قرار گرفته است (۶). واژه Autophagy به مفهوم خودخواری از کلمه یونانی "Auto" یعنی خود و "Phagy" به مفهوم خوردن آمده است (۷). این فرایند به‌عنوان یک مسیر کاتابولیسم در سلول‌های یوکاریوت‌ها به‌منظور مقابله با گرسنگی و حذف بخش‌های آسیب‌دیده سلول شکل گرفته است (۸). در پاسخ به استرس سلول، افزایش فرایند اتوفاژی منجر به حفظ هموستاز انرژی سلول می‌شود (۹). نکته جالب این است که هم‌زمان با تجمع چربی در کبد، اتوفاژی کاهش می‌یابد (۱۰).

افزایش سنتز و کاهش کاتابولیسم LDs، از عوامل افزایش محتوای چربی کبد و بروز NAFLD محسوب می‌شوند (۱۱). مطالعات نشان می‌دهد افزایش کاتابولیسم LDs از طریق القای اتوفاژی، به کاهش محتوای چربی کبد منجر می‌شود (۱۲). اهمیت اتوفاژی در متابولیسم LDs تا جایی است که افزایش بازگردش تری‌گلیسیرید^۴ (TG) در شرایط بیان بیش‌ازحد لیپاز تری‌گلیسیرید چربی^۵ (*Atgl*)، با سرکوب *Atg5* از طریق مهار کننده‌های دارویی اتوفاژی، تقریباً از بین می‌رود (۱۳).

اتوفاژی از طریق حذف پروتئین‌های پوششی قطرات چربی دسترسی لیپازها به سطح چربی‌ها را تسهیل می‌کند (۱۴). با توجه به این نتایج، به‌نظر می‌رسد عملکرد لیپازها نیز تا حدود زیادی وابسته به فعالیت اتوفاژی است. اختلال در اتوفاژی در بسیاری از بیماری‌های از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، کبد چرب و بیماری‌های عفونی مشاهده می‌شود (۱۵). به‌طور واضح مشخص نیست که نقص در فرایند اتوفاژی، اختلال متابولیسم چربی را به همراه دارد یا تجمع چربی سبب اختلال در فرایند اتوفاژی می‌شود. با این وجود، ارتباط مهمی بین تنظیم اتوفاژی و کنترل عوارض کبدی مرتبط با چاقی گزارش شده است (۱۶).

در مقابل درمان دارویی، کاهش وزن یک رویکرد مناسب برای بهبود متابولیسم کبد محسوب می‌شود، اما بیش از ۵۰ درصد از بیماران قادر نیستند به وزن مطلوب برسند (۱۷)؛ بنابراین ضرورت دارد علاوه بر محرک تغذیه‌ای و تمرینی، سایر محرک‌های احتمالی که در بهبود NAFLD اثرگذار هستند نیز مورد آزمایش قرار گیرند. شواهد نشان می‌دهند هیپوکسی می‌تواند سبب بروز برخی تغییرات در فرایند متابولیسم کبد گردد. برخی پژوهش‌ها از نقش هیپوکسی در راه‌اندازی مسیر اتوفاژی حمایت می‌کنند (۱۸). به‌طوری که یک دوره کوتاه‌مدت مصرف الکل می‌تواند، در مسیر متابولیسم خود سبب افزایش اکسیژن مصرفی می‌شود. این شرایط می‌تواند در قسمت‌هایی از کبد، کمبود اکسیژن و هیپوکسی را به‌دنبال داشته باشد (۱۹)، احتمالاً هیپوکسی متابولیکی ناشی از مصرف الکل سبب افزایش ژن‌های درگیر در فرایند اتوفاژی می‌شود.

در میان ژن‌های مختلفی که در فرایند اتوفاژی نقش دارند، *Ulk1*^۶ و *Atg5*^۷ تنظیم‌کننده‌های کلیدی اتوفاژی محسوب می‌شوند (۲۰، ۲۱). *Ulk1* در پستانداران بیشترین تنظیم رونویسی را در پاسخ به گرسنگی و سیگنال‌های شبانه‌روزی در کبد نشان می‌دهد (۲۲). *Atg5* نیز در میان ۴۱ پروتئین مرتبط با اتوفاژی، برای تشکیل ویزیکول^۸ اتوفاژیک ضروری است. مطالعات نشان می‌دهند احتمالاً رژیم غذایی پرچرب از طریق کاهش بیان

۵ Adipose Triglyceride Lipase

6 Unc-51 like autophagy activating kinase

7 Autophagy-related gene 5

8 Vesicle

1 Nonalcohol Fatty Liver Disease

2 Lipid Droplets

3 Autophagy

۴ Triglyceride



به صورت تصادفی در چهار گروه (هر گروه ۶ سر موش) به شرح ذیل تقسیم شدند: گروه ND: رت‌های دارای رژیم غذایی نرمال (۱۰ درصد کالری چربی، ۷۰ درصد کالری کربوهیدرات، ۲۰ درصد کالری پروتئین)، HFD: رت‌های دارای رژیم غذایی پرچرب (۶۰ درصد کالری چربی، ۲۰ درصد کالری کربوهیدرات، ۲۰ درصد کالری پروتئین) (۱)، HFD+NE: رت‌های دارای رژیم غذایی پرچرب و تمرین هوازی در شرایط نرم اکسی HFD+NE: رت‌های دارای رژیم غذایی پرچرب و تمرین هوازی در شرایط هیپوکسی HFD+HE. مداخله ورزشی روی رت‌های گروه‌های تمرینی به مدت ۱۲ هفته، سه جلسه در هفته انجام شد. در طی ۱۲ هفته گروه ND و HFD هیچ نوع فعالیت ورزشی نداشتند. لازم به ذکر است در طول مرحله آشناسازی با محیط و نوارگردان، رژیم غذایی نرمال برای موش‌ها در نظر گرفته شد. پس از مرحله آشناسازی رت‌هایی که قادر به دویدن نبودند، از گروه‌های تمرینی حذف شدند. دسترسی به آب و غذا در طول مدت مطالعه به صورت آزادانه بود. این مقاله بخشی از پژوهش مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهش‌کننده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی ایران با کد اخلاق IR.SSRI.REC.1401.1519 بود.

جدول ۱. مشخصات پروتکل تمرین

سرد کردن	تمرین اصلی	گرم کردن	هفته
زمان دقیقه	زمان دقیقه	زمان دقیقه	زمان دقیقه
۸-۱۲	آشناسازی		
۳	۱۵	۳	۱
۳	۲۴	۳	۳
۳	۲۸	۳	۴
۳	۳۲	۳	۵
۳	۴۹	۳	۱۲

برای تعیین شدت فعالیت ورزشی در تمرینات، آزمون حداکثر سرعت هوازی^{۱۰} (MAV) برای همه گروه‌های تمرینی اجرا شد. بدین منظور پس از ده دقیقه گرم کردن با سرعت ۵ m/min، سرعت نوار گردان به ۱۰ m/min افزایش یافت و پس از آن هر سه دقیقه ۵ m/min به سرعت نوار گردان اضافه می‌شد و این پروتکل تا رسیدن به ناتوانی در دویدن (۲۹) علی‌رغم ۱۰ ثانیه شوک الکتریکی ادامه یافت (۳۰). در شرایط هیپوکسی نیز پروتکل مشابه اجرا شد با این تفاوت که ابتدا ده دقیقه گرم کردن با سرعت

Atg5 و *Ulk1* در کبد موش‌ها سبب کاهش جریان اتوفاژی می‌شود و فعالیت ورزشی با معکوس کردن این روند سبب بهبود علائم کبد چرب می‌شود (۲۳). اگرچه تمامی مطالعات نتایج همسویی را ارائه نمی‌دهند (۲۴).

در سال‌های اخیر اشتیاق برای بررسی پارامترهای بیوشیمیایی که در آسیب کبدی ناشی از انباشت چربی نقش دارند افزایش یافته است. احتمالاً زمانی که کبد در مواجهه با مقادیر زیادی از چربی قرار می‌گیرد، به منظور پاک‌سازی اسیدهای چرب آزاد از خون شروع به جذب چربی می‌کند (۲۵) و با قرار دادن آن‌ها در یک محفظه از سمیت ناشی از افزایش اسیدهای چرب آزاد جلوگیری می‌نماید (۵). در شرایطی که مواد غذایی بیش از نیاز سلول باشد، مسیر هدف راپاماسین در پستانداران^۹ (mTOR) فعال و اتوفاژی را سرکوب می‌کند (۲۶). افزایش جریان اتوفاژی یکی از مکانیسم‌های احتمالی است که تمرین از طریق آن در بهبود کبد چرب مؤثر است (۲۷). در حمایت از این مطلب پژوهش‌های قبلی نشان دادند، حتی تمرینات هوازی کوتاه‌مدت سبب افزایش جریان اتوفاژی می‌گردد. نکته قابل توجه این که فرایند اتوفاژی در حضور افزایش مسیرهای آنابولیکی نظیر افزایش mTOR رخ می‌دهد (۲۸). اگرچه مطالعات نشان می‌دهند تمرین فعالیت ورزشی در کاهش بیماری‌های متابولیکی و بهبود شرایط پاتولوژیکی کبد نقش مهمی را ایفا می‌کند، اما مکانیسم‌های مولکولی آن، به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. علاوه بر این با توجه به نقش هیپوکسی در راه اندازی مسیر اتوفاژی تاکنون هیچ پژوهشی اثر تمرین در شرایط هیپوکسی بر بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی را مورد بررسی قرار نداده است.

بنابراین نتایج این مطالعه می‌تواند به روشن شدن مکانیسم‌های احتمالی که فعالیت ورزشی از طریق آن سبب جلوگیری از انباشت چربی در کبد می‌شود، کمک نماید. همچنین می‌تواند در انتخاب بهترین شیوه تمرینی نیز مؤثر باشد.

روش پژوهش

حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، (شش سر موش در هر گروه) تعیین شد. در این تحقیق ۲۴ سر رت نر از نژاد ویستار با سن تقریبی ۵ هفته و میانگین وزنی ۱۶۵±۲۹ گرم به عنوان نمونه تحقیق انتخاب شدند و مطابق با دستورالعمل‌های انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات و تهنه‌نامه کار با حیوانات آزمایشگاهی برای اهداف علمی به آزمایشگاه چوندگان دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان منتقل شدند. پس از دو هفته سازگاری با شرایط محیطی، موش‌ها

^{۱۰} Maximal Aerobic Velocity

9 Mammalian target of Rapamycin



CO₂ در طول مدت تمرین بین ۷۰۰-۳۵۰ ppm نوسان داشت که این میزان افزایش هیچ‌گونه اثر منفی روی موجودات زنده نخواهد داشت (۳۵). میزان تخلیه مولکول‌های هوا به‌گونه‌ای تنظیم شد تا رسیدن به فشار معادل ارتفاع ۳۰۰۰ متر ۱۰ دقیقه زمان نیاز داشته باشد. به‌عبارت‌دیگر کاهش فشار داخل اتاقک برابر با سرعتی معادل ۳۰۰ متر در دقیقه افزایش ارتفاع بود. برای شبیه‌سازی ارتفاع ۳۰۰۰ متر فشار اکسیژن در حدود ۱۴۰ میلی بار حفظ شد. انتخاب ارتفاع ۳۰۰۰ متر از آن‌جهت بود که نشان داده‌شده در این شرایط عملکردهای روزانه بدون هیچ‌گونه عکس‌العمل منفی حفظ خواهد شد (۳۶).

استخراج RNA و رونویسی معکوس Real Time-PCR

استخراج RNA از بافت کبد به روش غیر سنتونی و با استفاده از معرف RNX-PLUS شرکت سیناکلون (Cat No EX6101، سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. کمیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop One C, Thermo Scientific, USA) و کیفیت آن از طریق الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد (شکل ۲). برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت سیناکلون (Cat No RT5201، سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل آن استفاده شد. توالی ژن‌ها از سایت NCBI دریافت شده و برای ژن‌های *Ulk1 Atg5* و ژن *Gapdh* به‌عنوان ژن مرجع از طرق نرم‌افزار primer3 plus آغازگرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۲). برای تکثیر قطعات از مستر میکس Real-Time PCR شرکت سینا کلون (Cat No MM2062، سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل آن استفاده شد.

برنامه تکثیر قطعات cDNA در دستگاه Rotorgene Real-Time PCR (Q, Qiagen, USA) به‌صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت سه دقیقه، ۴۰ سیکل تکثیر با واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اختصاصی اتصال آغازگر به مدت ۲۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها محاسبه نقطه ذوب محصولات از دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه تنظیم شد. کارایی تکثیر برای هر آغازگر به‌صورت جداگانه محاسبه و کارایی بین ۹۰ تا ۱۱۰ برای محاسبه بیان هر ژن مطلوب در نظر گرفته شد. برای محاسبه بیان ژن از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد (۳۷).

۳ m/min انجام شد و سپس سرعت نوار گردان به ۵ m/min افزایش یافت. در پایان آزمون، سرعت ثبت شده احتمالاً بیانگر حالتی است که VO₂ در آن به فلات می‌رسد.

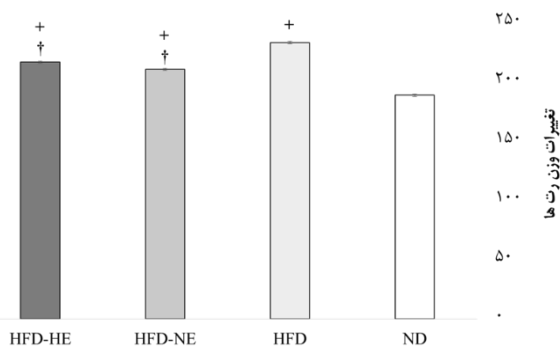
قبل از اجرای تمرین ۳ دقیقه گرم کردن با شدت پایین در نظر گرفته شده بود (۳۱). پروتکل تمرینی مورد استفاده در این پژوهش سه روز در هفته، به مدت ۱۲ هفته و به‌صورت پیش‌رونده، بدون شیب اجرا شد. هفته اول تمرین با شدتی معادل ۶۸ درصد MAV به‌دست آمده در شرایط هیپوکسی و نرم اکسی آغاز و تا هفته سوم با حفظ شدت زمان تمرین افزایش یافت. در هفته سوم شدت به ۷۵ درصد و در هفته پنجم به ۸۰ درصد رسید و پس از آن، زمان تمرین تا پایان هفته نهم افزایش یافت (۳۲). به‌منظور حفظ شدت مناسب تمرین در پایان هفته‌های چهارم و هشتم آزمون حداکثر سرعت هوازی مجدداً اجرا شد.

شبیه‌سازی هیپوکسی هیپوباریک

برای ایجاد شرایط هیپوکسی و کاهش فشار اکسیژن مطابق آنچه در ارتفاع رخ می‌دهد از روش کاهش فشار هوا (هیپوکسی هیپوباریک) استفاده شد (۳۳). برای این منظور اتاقکی به ابعاد ۱۰۰×۱۵۰×۱۰۰ سانتی‌متر از ورقه-های آهنی ۳ میلی‌متری پوشیده شده بارینگ الکترواستاتیک، توسط پژوهشگران این مطالعه در دانشگاه گیلان ساخته شد. از دو پمپ و کیوم مدل Value N115 VE به‌منظور خارج کردن مولکول‌های هوا و کاهش فشار هوای داخل دستگاه استفاده شد. میزان فشار درون اتاقک توسط حسگر الکترونیکی فشار مدل MPX5500، میزان CO₂ درون اتاقک توسط حسگر MG-812 با دقت ۰/۱ و اکسیژن توسط حسگر AlphaSense O2-A2 با دقت ۰/۱ درصد به‌صورت خودکار اندازه‌گیری شد. نتایج ثبت شده در شبیه‌سازی ارتفاعات مختلف نشان داد، در فشار ۴۳۳ میلی‌متر جیوه معادل ارتفاع ۴۵۰۰ متر از سطح دریا، با جریان ورود و خروج هوا، محیط داخل دستگاه در طول یک ساعت آزمایش به‌طور متوسط فشاری معادل $433/49 \pm 0/57$ را داشت. ضریب پراکندگی و خطای نسبی به دست آمده به ترتیب برابر ۰/۱۰۵ و ۰/۱۴۲ بود. در فشار ۶۸۴ میلی‌متر جیوه معادل ارتفاع تقریبی ۳۰۰۰ متر از سطح دریا ضریب پراکندگی و خطای نسبی به ترتیب برابر ۰/۰۸۸ و ۰/۰۸۶ به دست آمد. برای فشار ۵۳۰ میلی‌متر جیوه ضریب پراکندگی و خطای نسبی به ترتیب برابر ۰/۱۲۰ و ۰/۰۷۷ برای فشار ۵۷۰ میلی‌متر جیوه ضریب پراکندگی و خطای نسبی به ترتیب برابر ۰/۱۰۱ و ۰/۱۵۷ و برای فشار ۶۰۹ میلی‌متر جیوه ضریب پراکندگی و خطای نسبی به ترتیب برابر ۰/۱۰۹ و ۰/۱۵۲ بود. این نتایج بیانگر دقت دستگاه در شبیه‌سازی ارتفاعات مختلف و حفظ اختلاف فشار محیط داخل و خارج از اتاقک در طول مداخله بود. همانند سایر دستگاه‌های شبیه‌ساز ارتفاع، از جاذب شیمیایی سودالایم و سلیکا ژل به‌منظور حفظ سطح CO₂ و رطوبت داخل اتاقک استفاده شد (۳۴). میزان

افزایش $10/64 \pm 1/33$ برابری نسبت به گروه رژیم غذایی نرمال داشت ($p < 0/001$). این در حالی است که میزان محتوای چربی کبد در گروه HFD نسبت به گروه‌های HFD+NE و HFD+HE به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0/05$). اگرچه تمرین سبب شد محتوای چربی کبد رت‌ها در گروه HFD+NE و HFD+HE نسبت به گروه HFD کمتر شود، اما نتوانست سبب غیر معنی‌دار شدن تفاوت با گروه ND شود. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های HFD+NE و HFD+HE در کاهش محتوای چربی کبدی وجود نداشت ($p = 0/99$).

بر اساس نتایج حاصل از کمی‌سازی نسبی با روش $\Delta\Delta Ct$ ، رژیم غذایی پرچرب سبب کاهش $0/42 \pm 0/02$ برابری ژن *Atg5* (نمودار ۳) در گروه HFD نسبت به گروه ND گردید ($p < 0/05$). این کاهش در گروه‌های HFD+NE و HFD+HE به ترتیب $0/72 \pm 0/18$ و $0/7 \pm 0/08$ برابر بود ($p < 0/05$). کاهش $0/23$ برابری ژن *Ulk1* در گروه HFD نسبت به گروه ND مشاهده شد ($p < 0/001$). سطوح *Ulk1* در گروه‌های HFD+NE و HFD+HE به ترتیب $1/04 \pm 0/02$ و $1/71 \pm 0/18$ برابر ND بود. این میزان افزایش در گروه HFD+HE در سطح معناداری قرار گرفت ($p < 0/05$). تفاوت در گروه HFD+NE در مقایسه با گروه HFD+HE در سطح معناداری بود ($p < 0/05$).



نمودار ۱. میزان تغییر وزن رت‌ها ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD+NE: تمرین نرم‌اکسی + رژیم غذایی پرچرب، HFD+HE: تمرین هیپوکسی + رژیم غذایی پرچرب + اختلاف معنادار با گروه ND، † اختلاف معنادار با گروه HFD

رنگ‌آمیزی Oil Red: جهت بررسی محتوای چربی ذخیره شده کبد رنگ-آمیزی Oil Red O Stain ab با استفاده از کیت Oil Red

جدول ۲ مشخصات و توالی آغازگرهای استفاده شده در پژوهش

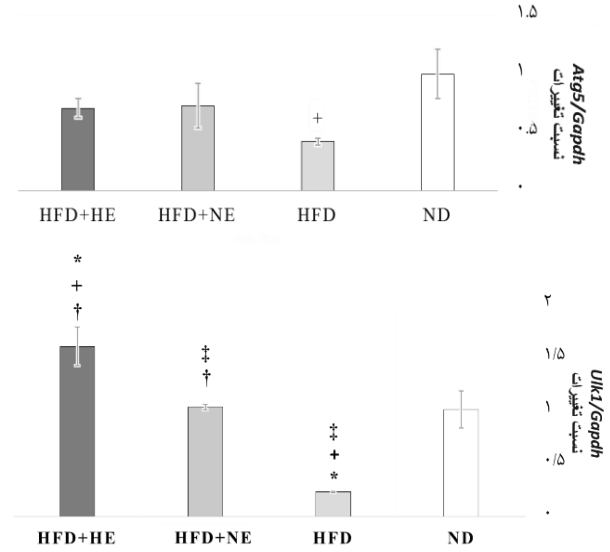
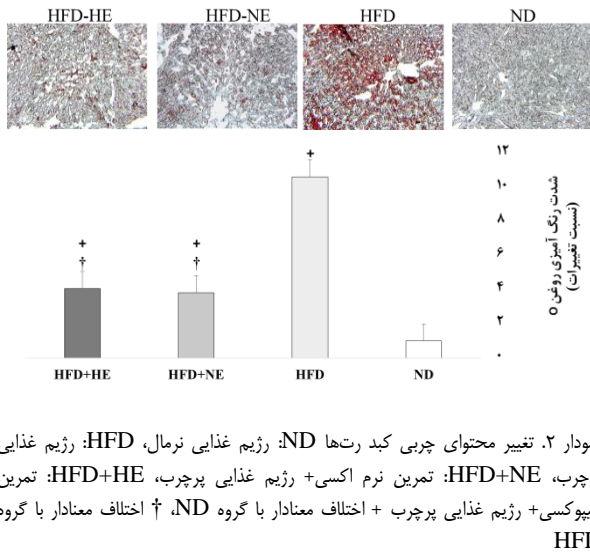
ژن	توالی آغازگرها
<i>Ulk1</i>	F 5'- TTGAAGCCCCAGAATCCT-3' R 5'- ACTGGTAGACAATGGTGCCA-3'
<i>Atg5</i>	F 5'-CAAGGATGCAGTTGAGGCTC-3' R 5'-AGTTTCCGGTTGATGGTCCA-3'
<i>Gapdh</i>	F 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3' R 5'-AGCCCAGGATGCCCTTAGT -3'

150678:lipid stain انجام شد. از میکروسکوپ نوری و فلورسنت شرکت Germany-AXIOM مدل BM-600 LED EPI FLUORESCENT برای دوربین میکروسکوپ Mshot ساخت کشور چین و نرم‌افزار J Image برای ارزیابی تعداد و مساحت قطرات چربی استفاده شد.

یافته‌ها

تغییرات وزن رت‌ها پس از مداخلات تغذیه‌ای و تمرینی در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد وزن رت‌ها در همه گروه‌ها افزایش یافت. این در حالی است که رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش معنی‌دار وزن گروه‌های HFD، HFD+NE، HFD+HE نسبت به گروه ND شد. به طوری که وزن گروه HFD در حدود $24 \pm 0/04$ درصد بیشتر از گروه ND بود. این میزان در گروه HFD+HE به ترتیب $13 \pm 0/09$ درصد و $16 \pm 0/09$ درصد بیشتر از گروه ND بود. نتایج آزمون واریانس یک راهه نشان داد، وزن رت‌ها در گروه‌های HFD+NE و HFD+HE به طور معنی‌داری نسبت به گروه HFD کمتر بود ($p < 0/01$).

با روش رنگ‌آمیزی Oil Red Oil Stain مطابق نمودار ۲ مشخص شد، محتوای چربی کبد رت‌های در گروه‌های دارای رژیم غذایی پرچرب



نمودار ۲. تغییر محتوای چربی کبد رت‌ها ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD+NE: تمرین نرم اکسی + رژیم غذایی پرچرب، HFD+HE: تمرین هیپوکسی + رژیم غذایی پرچرب + اختلاف معنادار با گروه ND. † اختلاف معنادار با گروه HFD

نمودار ۳. تغییرات ژن *Atg5* و *Utk1*: ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD+NE: تمرین نرم اکسی + رژیم غذایی پرچرب، HFD+HE: تمرین هیپوکسی + رژیم غذایی پرچرب. + اختلاف معنادار با گروه ND، † اختلاف معنادار با گروه HFD، * اختلاف معنادار با گروه HFD+NE، ‡ اختلاف معنادار با گروه HFD+HE

بحث

با چاقی اندازه‌گیری نشد، اما ایتو و همکاران^۱ نشان دادند پس از ده هفته رژیم غذایی پرچرب چاقی، مقاومت به انسولین و پس از دوازده هفته عدم تحمل گلوکز به وجود می‌آید (۱).

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، وزن بدن رت‌ها به‌طور پیوسته در طول دوازده هفته در تمامی گروه‌ها افزایش یافت. با این حال، دوازده هفته رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش بیشتر وزن بدن نسبت به رژیم غذایی نرمال شد. در بخش دیگر بیانگر آن بود که دوازده هفته رژیم غذایی پرچرب سبب افزایش قطرات چربی ذخیره‌شده در کبد گردید. پژوهش‌های دیگر نیز نشان دادند رژیم غذایی پرچرب سبب بروز NAFLD پس از ۱۲-۱۰ هفته خواهد شد (۳۸). کبد چرب همچنین می‌تواند توسط انواع دیگر رژیم‌ها، مانند رژیم‌های غذایی با کلسترول بالا، رژیم‌های غذایی حاوی اتانول، کمبود کولین-متیونین و رژیم‌های غذایی با ساکاروز بالا ایجاد شود (۳۹). نتایج مطالعه حاضر، با استفاده از اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی، نتایج مطالعات قبلی را تأیید نمود و نشان داد که کبد چرب را می‌توان با رژیم غذایی پرچرب (۶۰ درصد کالری از چربی) بدون مصرف سموم یا رژیم‌های غذایی فاقد کمبود مواد مغذی القا کرد. افزایش محتوای چربی کبد در گروه‌های دارای رژیم غذایی پرچرب همسو با مطالعاتی است که نشان می‌دهند سبک زندگی غیرفعال و رژیم غذایی پرکالری احتمال افزایش ابتلا به کبد چرب را افزایش می‌دهند (۴۰). اگرچه در مطالعه حاضر مقاومت به انسولین و سایر بیماری‌های متابولیکی مرتبط

به‌نظر می‌رسد متابولیسم غیرطبیعی اسید چرب ناشی از چاقی که به‌طور هم‌زمان در بافت چربی و کبد رخ می‌دهد و همچنین التهاب سیستمی از عوامل مؤثر در بیماری‌های متابولسمی مرتبط با NAFLD هستند (۴۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد، مداخله تمرینی با رژیم غذایی پرچرب در طول دوازده هفته، باعث تخفیف در افزایش چربی کبدی نسبت به گروه HFD می‌شود. هرچند در گروه‌های تمرینی همچنان میزان تجمع چربی کبدی نسبت به گروه رژیم غذایی نرمال، بالاتر (تقریباً چهار برابر) بود. افزایش تام اکسیداسیون چربی‌ها به‌منظور مشارکت در تولید انرژی در حین فعالیت ورزشی (۴۲) یکی دیگری از مکانیسم‌هایی است که احتمالاً سبب تجمع چربی کمتر در کبد رت‌های گروه تمرینی شده است. مطالعاتی که نشان می‌دهند، تمرین هوازی به‌طور کامل اثر مخرب رژیم غذایی پرچرب را در رت‌ها از بین می‌برد، از رژیم غذایی با درصد چربی کمتر (۴۰) درصد کالری از چربی) و تعداد جلسات تمرینی بیشتر (۵ جلسه در هفته) استفاده کرده بودند (۴۳). احتمالاً ایجاد تعادل در کالری چه از طریق کاهش کالری دریافتی و یا افزایش کالری مصرفی می‌تواند منجر به بهبود علائم کبد چرب گردد.

تجمع چربی در بافت کبد هم‌زمان با افزایش اتوفاگوزوم‌ها در سلول‌های کبدی (افزایش اتوفاگوزوم‌ها بیانگر کاهش فیوژن میان اتوفاگوزوم و

^۱ Ito

افکتورهای پایین‌دست، با افزایش بیان ژن‌هایی نظیر LC3 و ATG5 اتوفازی را القا می‌کند. تمام این عوامل نسخه‌برداری، قویاً اتوفازی را کنترل می‌کنند (۵۱).

مطالعات سینگ^۲ و همکاران نشان داد اتوفازی نقش مهمی در متابولیسم لیپید ایفا می‌کند و مهار اتوفازی باعث افزایش ذخیره چربی کبد در هنگام گرسنگی می‌شود (۶)؛ بنابراین، با توجه به فعالیت بیشتر ژن‌های درگیر در فرایند اتوفازی به‌طور عمده از طریق *Ulk1* در گروه HFD+HE و کاهش تجمع چربی کبدی در شرایط مصرف کمتر انرژی در حین فعالیت ورزشی در مقایسه با گروه HFD+NE احتمالاً فعالیت ورزشی در شرایط هیپوکسی از طریق القای اتوفازی در بهبود علائم کبد چرب نقش دارد.

با توجه به افزایش *Ulk1* و عدم تغییر معنی‌دار در *Atg5* در گروه‌های HFD+NE و HFD+HE این احتمال مطرح می‌شود که احتمالاً *Ulk1* از مسیر دیگری اتوفازی را فعال نماید. اتوفازی در پستانداران می‌تواند حداقل از طریق دو مسیر مختلف رخ دهد مسیر وابسته به *Atg5/Atg7* به‌عنوان مسیر متعارف^۳ و مسیر مستقل از *Atg5 / Atg7* که به‌عنوان مسیر جایگزین^۴ شناخته می‌شود (۵۲). تصور می‌شود مسیر متعارف از غشا ER نشات گرفته باشد. در مقابل، اتوفازی جایگزین مستقل از *Atg5* و *Atg7* رخ می‌دهد. در اتوفازی جایگزین، وزیکول‌ها از ترانس گلژی مشتق شده و وابسته به *Rab9* است. کوبایاشی^۵ و همکاران، این فرضیه را مطرح کردند که اتوفازی جایگزین به‌منظور محافظت در برابر آسیب‌های ناشی از کاهش اتوفازی متعارف، فعال می‌شود (۵۳)؛ که لازم است در پژوهش‌های بعدی مورد مطالعه قرار گیرد. از سوی دیگر کاهش فشار اکسیژن محیط و افزایش نیاز به مصرف اکسیژن توسط بافت عضلانی در حین فعالیت ورزشی به همراه کاهش جریان خون بافت کبد (۵۴)، احتمالاً در قسمت‌هایی از کبد کمبود اکسیژن و هیپوکسی حاد را به دنبال دارد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند افزایش *Atg5*، *Lc3 II/I* ناشی از هیپوکسی وابسته به زمان است (۵۵)؛ بنابراین این احتمال وجود دارد که با افزایش مدت قرارگیری در معرض هیپوکسی شاهد مهار کاهش *Atg5* باشیم.

به نظر می‌رسد مجموع این عوامل سبب به راه افتادن مسیر اتوفازی می‌شوند و این افزایش فعالیت ممکن است یکی از دلایل احتمالی تجمع کمتر چربی کبد، در رت‌های گروه تمرینی باشد. به‌طور کلی، نتایج مطالعه حاضر همسو با مطالعاتی است که نشان می‌دهند فعالیت ورزشی سبب القای اتوفازی در سلول‌های کبدی می‌گردد (۵۶). اگرچه ما کاهش بیان ژن‌های درگیر در اتوفازی را در کبد موش‌های تحت رژیم غذایی پرچرب مشاهده

لیوزم‌ها است) و کاهش جریان اتوفازی رخ می‌دهد (۱۰). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد رژیم غذایی پرچرب از طریق کاهش بیان ژن‌های *Ulk1* و *Atg5* احتمالاً اتوفازی را کاهش می‌دهند. مطالعات نشان می‌دهد اتوفازی مانع مرگ سلولی می‌شود؛ زیرا خاموش کردن *Beclin1* (که عامل مهمی در اتوفازی محسوب می‌شود) و حذف *Atg5* منجر به افزایش مرگ سلول می‌شود (۴۴)؛ بنابراین کاهش بیان ژن *Atg5* در گروه HFD احتمالاً سبب افزایش مرگ سلولی و مشکلات جدی‌تر کبدی می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد رژیم غذایی پرچرب سبب کاهش بیان ژن *Ulk1* کبد در گروه HFD نسبت به گروه ND تا میزان ۰/۲۳ گردید. در مقابل مداخله تمرینی سبب معکوس شدن این روند و افزایش سطوح *ULK1* شد. همسو با نتایج مطالعه حاضر سایر تحقیقات نیز نشان می‌دهند رژیم غذایی پرچرب سبب کاهش بیان ژن *Ulk1* در کبد می‌شود (۴۵). در مطالعه گائو و همکاران نیز نشان داده شد که رژیم غذایی پرچرب سبب کاهش فعالیت *Ulk1* و تمرین هوازی سبب فسفوریلاسیون ناحیه SER555 و افزایش فعالیت آن شد (۴۶). لی^۱ و همکاران بر این باورند که فعالیت ورزشی احتمالاً مسیر *Ampk/Sirt1* را تقویت می‌کند و از این مسیر اتوفازی را فعال می‌کند (۴۵). نکته قابل توجه دیگر تحقیق حاضر این است که تمرین در شرایط هیپوکسی در مقایسه با شرایط نرم اکسی باعث افزایش معنادار بیان *Ulk1* شد. این نتایج نیز با مطالعاتی که نشان می‌دهند هیپوکسی سبب افزایش فعالیت اتوفازی در بافت کبدی می‌شود همخوانی دارد (۴۷). نتیجه مطالعه حاضر در راستای نتایجی است که نشان می‌دهند فعال شدن *Ulk1* برای شروع اتوفازی ناشی از هیپوکسی ضروری است (۴۸). اگرچه در پژوهش حاضر تغییرات سطح *Ampk* اندازه‌گیری نشد اما گائو و همکاران نشان دادند فعالیت *Ampk* توسط HFD سرکوب و فعالیت ورزشی فعالیت آن را افزایش می‌دهد (۴۶). شواهد نشان می‌دهد که ارتباط *Ampk* با *Ulk1* نقش مهمی در القای اتوفازی دارد. *Ampk* با فسفوریلاسیون Raptor اثر مهاری *Mtor* بر روی کمپلکس *Ulk1* را برداشته و فعالیت اتوفازی را افزایش دهد (۴۹)؛ بنابراین احتمالاً فعالیت ورزشی از طریق افزایش *Ampk*، افزایش جریان اتوفازی را به همراه دارد. فاکتور رونویسی HIF-1 یکی دیگر از مسیرهای است که در پاسخ به هیپوکسی فعال می‌شود، HIF-1 ترجمه BNIP3 و NIX را افزایش می‌دهد. محصولات پروتئینی این فاکتورها با BECLIN-1 برای اتصال به BCL2 در رقابت هستند، بنابراین BECLIN-1 آزاد و به دنبال آن اتوفازی القا می‌شود (۵۰). بیان PERK که به‌عنوان حسگر استرس ER شناخته می‌شود، نیز به‌واسطه هیپوکسی افزایش می‌یابد. PERK از طریق

^۴ Alternative Autophagy

^۵ Kobayashi

^۱ Li

^۲ Singh

^۳ Conventional Autophagy



HFD+HE بیان ژن *Ulk1* بالاتر بود اما اثر مازادی بر کاهش محتوای چربی کبد نداشت. ضمن اینکه هیچ‌یک از روش‌های تمرینی نتوانستند محتوای چربی کبد را به سطح پایه بازگردانند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری دانشجوی رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه گیلان به شماره دانشجویی ۹۶۱۷۱۰۳۰۰۱ است. پژوهشگران بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود از مسئولان محترم دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان را اعلام می‌دارند.

تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان اعلام می‌کنند هیچ‌گونه تعارض منافی در این مقاله وجود ندارد.

- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*. 2010;12(9):814-22.
- Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010;330(6009):1344-8.
- Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *Journal of cell biology*. 2009;186(6):773-82.
- Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 2016;64(6):1994-2014.
- Bonen A, Chabowski A, Luiken JJP, Glatz JF. Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology*. 2007.
- Parafati M, Lascala A, Morittu VM, Trimboli F, Rizzuto A, Brunelli E, et al. Bergamot polyphenol fraction prevents nonalcoholic fatty liver disease via stimulation of lipophagy in cafeteria diet-induced rat model of metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(9):938-48.
- Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL promotes autophagy/lipophagy via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism. *Cell reports*. 2017;19(1):1-9.

کردیم، اما علت این نقص و به‌ویژه مکانیسم‌هایی که منجر به کاهش *Ulk1* و *Atg5* می‌شوند، واضح نیست. از آنجایی که چاقی با افزایش تجمع چربی در کبد همراه است، احتمالاً اضافه‌بار مزمن لیپید یا لیپوژنز پایدار ممکن است یکی از محرک‌های نقص در اتوفاژی باشد. به دلیل این که *Ulk1* و *Atg5* تحت تأثیر عوامل مولکولی دیگری نظیر *Mtor*، *Foxo3* و *Akt* قرار می‌گیرند (۴۶)، لازم است در مطالعات بعدی بیان این ژن‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد رژیم غذایی پرچرب سبب کاهش سطوح ژن‌های درگیر در فرایند اتوفاژی (*Ulk1* و *Atg5*) و افزایش ذخیره LDs در کبد می‌شود. احتمالاً به راه افتادن جریان اتوفاژی به‌واسطه تمرین، یکی از مکانیسم‌های احتمالی تخفیف علائم کبد چرب است. اگرچه در گروه

Reference

- Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology Research*. 2007;37(1):50-7.
- Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2004;53(8):2087-94.
- Kim Y, Han E, Lee JS, Lee HW, Kim BK, Kim MK, et al. Cardiovascular risk is elevated in lean subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Gut and liver*. 2022;16(2):290.
- Roberts FL, Markby GR. New Insights into Molecular Mechanisms Mediating Adaptation to Exercise; A Review Focusing on Mitochondrial Biogenesis, Mitochondrial Function, Mitophagy and Autophagy. *Cells*. 2021;10(10):2639.
- Schulze RJ, McNiven MA, editors. Lipid droplet formation and lipophagy in fatty liver disease. *Seminars in liver disease*; 2019: Thieme Medical Publishers.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458(7242):1131-5.

White Adipose Tissue of High Fat Diet-Induced Obese Mice. 2021.

25. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1049-61.

26. Kim YC, Guan K-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(1):25-32.

27. Cook JJ, Wei M, Segovia B, Cosio-Lima L, Simpson J, Taylor S, et al. Endurance exercise-mediated metabolic reshuffle attenuates high-caloric diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*. 2022;27(4):100709.

28. Kwon I, Song W, Jang Y, Choi MD, Vinci DM, Lee Y. Elevation of hepatic autophagy and antioxidative capacity by endurance exercise is associated with suppression of apoptosis in mice. *Annals of hepatology*. 2020;19(1):69-78.

29. Çolak R, Ağaçcıoğlu E, Çakatay U. "Live High Train Low" Hypoxic Training Enhances Exercise Performance with Efficient Redox Homeostasis in Rats' Soleus Muscle. *High Altitude Medicine & Biology*. 2021;22(1):77-86.

30. Gamelin F-X, Aucouturier J, Iannotti FA, Piscitelli F, Mazzarella E, Aveta T, et al. Effects of chronic exercise on the endocannabinoid system in Wistar rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of physiology and biochemistry*. 2016;72:183-99.

31. Gilliam P, Spirduso W, Martin T, Walters T, Wilcox R, Farrar R. The effects of exercise training on [3H]-spiperone binding in rat striatum. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1984;20(6):863-7.

32. Ahmadi A, Sheikholeslami-Vatani D, Ghaeni S, Baazm M. The effects of different training modalities on monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), and PGC-1 α gene expression in rat skeletal muscles. *Molecular Biology Reports*. 2021;48:2153-61.

33. Flores K, Siques P, Brito J, Ordenes S, Arriaza K, Pena E, et al. Lower body weight in

14. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature cell biology*. 2015;17(6):759-70.

15. Alex S, Boss A, Heerschap A, Kersten S. Exercise training improves liver steatosis in mice. *Nutrition & metabolism*. 2015;12(1):1-11.

16. Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease. *BioMed research international*. 2014;2014.

17. van der Windt DJ, Sud V, Zhang H, Tsung A, Huang H. The effects of physical exercise on fatty liver disease. *Gene expression*. 2018;18(2):89.

18. Ma Y, Zhou Y, Zhu Y-C, Wang S-Q, Ping P, Chen X-F. Lipophagy contributes to testosterone biosynthesis in male rat Leydig cells. *Endocrinology*. 2018;159(2):1119-29.

19. Ding WX, Li M, Chen X, Ni HM, Lin CW, Gao W, et al. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1740-52.

20. Ye X, Zhou X-J, Zhang H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2334.

21. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(2):132-9.

22. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *autophagy*. 2021;17(1):1-382.

23. 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(1):80-9.

24. Daneshyar S, Tavoosidana G, Jalali-Moghim F, Amani-Shalamzari S. Effect of Exercise Training On Autophagic Process in

fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *Journal of applied physiology*. 2003;94(6):2127-34.

44. Althaus J, Bernaudin M, Petit E, Toutain J, Touzani O, Rami A. Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochemistry international*. 2006;48(8):687-95.

45. Li H, Dun Y, Zhang W, You B, Liu Y, Fu S, et al. Exercise improves lipid droplet metabolism disorder through activation of AMPK-mediated lipophagy in NAFLD. *Life Sciences*. 2021;273:119314.

46. Gao Y, Zhang W, Zeng L-Q, 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 biology*. 2020;36:101635.

47. Ni H-M, Bhakta A, Wang S, Li Z, Manley S, Huang H, et al. Role of hypoxia inducing factor-1 β in alcohol-induced autophagy, steatosis and liver injury in mice. *PLoS One*. 2014;9(12):e115849.

48. Li J, Zhang T, Ren T, Liao X, Hao Y, Lim JS, et al. Oxygen-sensitive methylation of ULK1 is required for hypoxia-induced autophagy. *Nature communications*. 2022;13(1):1172.

49. Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang H-G. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PloS one*. 2010;5(11):e15394.

50. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer research*. 2001;61(18):6669-73.

51. Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(1):30-8.

52. Arakawa S, Honda S, Yamaguchi H, Shimizu S. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2017;93(6):378-85.

rats under hypobaric hypoxia exposure would lead to reduced right ventricular hypertrophy and increased AMPK activation. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:342.

34. Wu F-F, Zhang K-L, Wang Z-M, Yang Y, Li S-H, Wang J-Q, et al. Benefit of a single simulated hypobaric hypoxia in healthy mice performance and analysis of mitochondria-related gene changes. *Scientific Reports*. 2021;11(1):4494.

35. Azuma K, Kagi N, Yanagi U, Osawa H. Effects of low-level inhalation exposure to carbon dioxide in indoor environments: A short review on human health and psychomotor performance. *Environment international*. 2018;121:51-6.

36. Wang R, Guo S, Tian H, Huang Y, Yang Q, Zhao K, et al. Hypoxic training in obese mice improves metabolic disorder. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10:527.

37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001;25(4):402-8.

38. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, Van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. *Obesity research*. 2002;10(9):956-63.

39. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(19):2300.

40. Das K, Das K, Mukherjee PS, Ghosh A, Ghosh S, Mridha AR, et al. Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. *Hepatology*. 2010;51(5):1593-602.

41. Green CJ, Hodson L. The influence of dietary fat on liver fat accumulation. *Nutrients*. 2014;6(11):5018-33.

42. Muscella A, Stefano E, Lunetti P, Capobianco L, Marsigliante S. The regulation of fat metabolism during aerobic exercise. *Biomolecules*. 2020;10(12):1699.

43. Gauthier M-S, Couturier K, Latour J-G, Lavoie J-M. Concurrent exercise prevents high-



53. Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(2):252-61.
54. Heinonen IHA, Kalliokoski KK, Hannukainen JC, Duncker DJ, Nuutila P, Knuuti J. Organ-specific physiological responses to acute physical exercise and long-term training in humans. *Physiology*. 2014;29 6:421-36.
55. Huang S, Qi P, Zhang T, Li F, He X. The HIF-1 α /miR-224-3p/ATG5 axis affects cell mobility and chemosensitivity by regulating hypoxia-induced protective autophagy in glioblastoma and astrocytoma. *Oncol Rep*. 2019;41(3):1759-68.
56. 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(11):11870.