January & February 2024. Vol 22. No 6

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Research Paper

Effect of Aerobic Physical Activity While Fasting on Liver Lipophagy-Related Factors (ULK1 and LC3-II) in Male Wistar Rats

Motahareh Shabihi[1], *Habib Asgharpour[2], Asra Askari[3]

1. PhD Student, Department of Physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran.
3. Assistant Professor of Sports Physiology, Department of Physical Education, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shabihi M, Asgharpour H, Askari A. [Effect of Aerobic Physical Activity While Fasting on Liver Lipophagy-Related Factors (ULK1 and LC3-II) in Male Wistar Rats (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2024; 22(6):745-755. 10.32592/JSMJ.22.6.745

https://doi.org/10.32592/JSMJ.22.6.745

ABSTRACT

Background and Objectives ULK1 and LC3-II are factors related to liver lipophagy. The purpose of this research was to investigate the effect of four weeks of aerobic training in fasting state on factors related to liver lipophagy (ULK1 and LC3-II) in male Wistar rats.

Subjects and Methods In this experimental research, 30 male Wistar rats were randomly divided into the following groups: control, fasting, 3 days of training, 5 days of training, fasting + 3 days of training, and fasting + 5 days of training. Unlike other rats that had 24-hour access to food, the fasting rats received the same amount of nutrition in 10 hours. Continuous aerobic running on a treadmill was performed for 4 weeks with a frequency of 3 and 5 sessions per week in both feeding and fasting conditions. Statistical analysis was done by SPSS using one-way variance analysis test and LSD. Significance level was set at $P < 0.05$.

Results The increase of LC3-II in the groups of fasting + 3 days of training and fasting + 5 days training was significant compared to fasting and 3 days training groups ($P < 0.05$). Also, the increase of ULK1 in the groups of 3 days of training and fasting + 3 days of training was significant compared to the fasting group, and the changes of ULK1 were significantly higher in fasting + 3 days of training group than in the fasting + 5 days training group ($P < 0.05$).

Conclusion It can be said that aerobic training in fasting mode increases liver lipophagy and the expression of ULK1 and LC3-II genes is different compared to the amount of weekly activity.

Keywords Aerobic training, Liver, Lipophagy, Fasting

Received: 14 Jan 2024
Accepted: 04 Feb 2024
Available Online: 29 Feb 2024

Corresponding Author:
Habib Asgharpour
Address: Department of Physical Education and Sports Sciences, Aliabad Katul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katul, Iran.
Tel: +989113922124
E-Mail: Habibasgharpour@gmail.com

Extended Abstract

Introduction

The catabolic process of autophagy, a well-known process of bulk cytoplasmic recycling and cell self-renewal, is the central regulator of lipid metabolism in the liver (3). Lipophagy is a form of selective autophagy and a new type of lipid metabolism that has recently received scholarly attention. Lipophagy is defined as the autophagic degradation of intracellular lipid droplets (LDs) (4). Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) plays a key role in the induction of autophagy in response to starvation (6). Also, during autophagy, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) binds to the phosphatidylethanolamine molecule on the separation membrane as lipidated LC3 (LC3-II), an autophagy substrate (5). Considering the role of ULK1 and LC3 in liver lipophagy, researchers' attention has been drawn to these factors that are associated with lipophagy. Studies have shown that food deprivation conditions such as fasting conditions create a series of coordinated metabolic and hormonal changes to maintain the metabolic balance of the organism and cellular homeostasis. One of the cellular changes that occur under fasting conditions is the activation of hepatic autophagy and lipophagy, which are important for maintaining cellular homeostasis and energy balance, quality control, cellular and tissue regeneration, and defense against extracellular damage and pathogens (8). Another factor related to the metabolism of fats in the liver is exercise. Exercise training can induce changes in the lipid composition of membranes that not only affect fluidity and cellular function but also alter the cellular environment and circulating lipids that regulate signaling cascades (9). Previous research has shown that exercise increases lipolysis as well as lipophagy (10, 11). Dynamic changes in these fat pools during and after exercise are important and key factors that may be responsible for regulating changes in fat oxidation in response to different exercise conditions (9). According to the above-mentioned argument, the aim of the present study was to compare the effect of aerobic exercise under feeding and fasting conditions on gene expression of factors related to liver tissue lipophagy in male Wistar rats.

Methods

In this experimental research, 30 male rats aged 18 weeks with an average weight of 348 ± 25.53 grams were selected, and after a one-week familiarization with the laboratory environment, they were randomly divided into 6 groups of 5 including control, fasting, fasting + 3 days of training, fasting + 5 days of training, 3 days of training, and 5 days of training. The fasting protocol was for four weeks and was applied daily for 14 hours during the waking cycle (17:30 pm to 7:30 am) of the rats. In order to induce fasting, the rats in the fasting group consumed the same amount of normal food (10 grams per 100 grams of rat weight) that the other groups received during 24 hours within 10 hours. In the training groups, in order to familiarize and adapt the animals with the environment, they were placed on the treadmill for 15 minutes in the first week. After the familiarization phase, the continuous aerobic exercise started which included running on the treadmill for 45-60 minutes with frequencies of 3 and 5 days per week continued for 4 weeks. The main training program of rats on a treadmill with a zero-degree incline at a speed of 14 meters per minute in the first week reached a speed of 16 and 18 meters per minute with a zero-degree incline in the following weeks (13). ULK1 and LC3-II gene expression levels were measured by quantitative real-time method. One-way analysis of variance statistical method was used to compare the investigated variables in the research groups, and in case of significance, LSD post hoc test was used to find the place of difference. Statistical analysis was done using SPSS version 26, and a significant level was set at $P < 0.05$.

Results

According to the results obtained from one-way analysis of variance, a significant difference was observed in the expression of LC3-II gene ($P<0.001$) and ULK1 ($P<0.001$). In further investigations, the results of the LSD test showed that the level of LC3-II in the group of 5 days of training ($P < 0.014$), fasting + 3 days of training ($P < 0.001$), and fasting + 5 days of training was significantly higher than that in the control group ($P < 0.001$). Also, the level of LC3-II was significantly higher in the groups of fasting + 3 days of training ($P = 0.009$) and fasting + 5 days of training ($P = 0.027$) compared to the fasting group. Also, the level of LC3-II was significantly higher in the groups of fasting + 3 days of training ($P < 0.001$) and fasting + 5 days of training ($P < 0.001$) compared to the groups of 3 days of training and 5 days of training. Also, the results of the LSD test showed that the level of ULK1 in the groups of 3 days of training (P-0.008), 5 days of training ($P = 0.009$), fasting + 3 days of training ($P < 0.001$) and fasting + 5 days of training ($P = 0.018$) were significantly higher than that in the control group. Also, the level of ULK1 was significantly higher in the fasting + 3-day training group ($P = 0.009$) compared to the fasting group. Also, the level of ULK1 in the group of fasting + 5 days of training ($P = 0.029$) was significantly lower than that in the group of fasting + 3 days of training.

Conclusion

Overall, the results of this research showed that sports training increased the expression of ULK1 and LC3-II genes, and the increase of ULK1 was more sensitive to sports training. There were significant changes with the frequency of 3 training sessions, while a higher training frequency was required for the increase of LC3-II. Also, the results showed that in the protocols where exercise training was done in the fasting state, higher frequency had no effect on LC3-II, but in ULK1 changes, training frequency of 3 sessions per week was more effective than 5 sessions per week. However, more research is needed for the mechanisms related to the effect of frequency of training in the fasting state on the expression of genes related to lipophagy.

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

In the current research, the ethical principles of working with animals were approved by the Research Ethics Committee of the Islamic Azad University, Ali Abad Katul branch (R.IAU.AK.REC.1399.026).

Funding

This article has no financial sponsor.

Authors contributions

Original idea and article: Motahreh Sokhani, Habib Asgharpour; Conducting research and extracting data: Motahreh Shokhani, Habib Asgharpour, Esra Askari.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to all those who helped us in conducting this research

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

مقاله پژوهشی

اثر فعالیت جسمانی هوازی در فستینگ بر عوامل مرتبط با لیپوفاژی کبدی (ULK1 و LC3-II)در رت های ویستار نر

مطهره شبیهی[۱]، *حبیب اصغرپور[۲]، اسرا عسکری[۳]

۱. دانشجوی دکتری، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران.
۲. استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران.
۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shabihi M, Asgharpour H, Askari A. [Effect of Aerobic Physical Activity While Fasting on Liver Lipophagy-Related Factors (ULK1 and LC3-II) in Male Wistar Rats (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2024; 22(6):745-755. 10.32592/JSMJ.22.6.745

https://doi.org/10.32592/JSMJ.22.6.745

CC BY NC

چکیده

زمینه و هدف ULK1 و LC3-II از عوامل مرتبط با لیپوفاژی کبدی هستند. هدف این تحقیق بررسی تاثیر چهار هفته تمرین هوازی در حالت فستینگ بر عوامل مرتبط با لیپوفاژی کبدی (ULK1 و LC3-II)در رت های ویستار نر بود.

روش بررسی در تحقیق تجربی حاضر تعداد ۳۰ سر رت ویستار نر به صورت تصادفی به گروه‌های کنترل، ناشتا، ۳-روز تمرین، ۵-روز تمرین، فستینگ +۳-روز تمرین و فستینگ +۵-روز تمرین تقسیم شدند. بر خلاف سایر رت ها که دسترسی ۲۴ ساعته به غذا داشتند، در گروه های فستینگ، همان مقدار تغذیه را در طی ۱۰ ساعت دریافت کردند. دویدن هوازی تداومی روی تریدمیل به مدت ۴ هفته با تواتر ۳ و ۵ جلسه در هفته و در دو شرایط تغذیه و فستینگ انجام شد. تجزیه وتحلیل آماری با نرم افزار SPSS و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و LSD و سطح معنی داری ($p \leq ۰/۰۵$) انجام شد.

یافته ها افزایش LC3-II در گروه های فستینگ +۳-روز تمرین و فستینگ + ۵-روز تمرین نسبت به گروه های فستینگ و ۳-روز تمرین معنی دار بود ($P<۰/۰۵$). همچنین افزایش ULK1 در گروه های ۳روز تمرین و فستینگ +۳-روز تمرین نسبت به گروه فستینگ معنی دار بود و تغییراتULK1 به صورت معنی داری در گروه فستینگ +۳-روز تمرین نسبت به گروه فستینگ + ۵-روز تمرین بشتر بود ($P< ۰/۰۵$).

نتیجه گیری می توان گفت که تمرینات هوازی در حالت فستینگ موجب افزایش لیپوفاژی کبدی می شود و بیان ژن های ULK1 و LC3-II نسبت به حجم فعالیت هفتگی متفاوت می باشد.

کلیدواژه ها تمرین هوازی، کبد، لیپوفاژی، فستینگ

تاریخ دریافت: ۲۴ دی ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۵ بهمن ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۱۵ اسفند ۱۴۰۲

نویسنده مسئول:
حبیب اصغرپور
نشانی: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران.
تلفن: ۰۹۱۱۳۹۲۲۱۲۴
رایانامه: Habibasgharpour@gmail.com

مقدمه

کبد یک تنظیم کننده کلیدی هموستاز انرژی سیستمیک است و می‌تواند از طریق تداخل با بافت های مختلف، کمبود و کمبود مواد مغذی را حس کند و به آن پاسخ دهد. تنظیم هموستاز انرژی سیستمیک توسط کبد تا حدی از طریق تنظیم متابولیسم گلوکز و لیپید انجام می شود [۱, ۲]. کبد یک اندام مرکزی ذخیره کننده چربی است که آن را به ویژه در برابر استئاتوز و همچنین التهاب و متعاقب آن سیروز حساس می کند. مکانیسم هایی که توسط آن کبد لیپید ذخیره شده را برای تولید انرژی بسیج می کند، به طور ناقص تعریف شده است. فرآیند کاتابولیک اتوفاژی، فرآیند شناخته شده بازیافت سیتوپلاسمی حجیم و خود بازسازی سلولی، تنظیم کننده مرکزی متابولیسم لیپید در کبد است. در دهه گذشته، مطالعات متعددی شکل انتخابی اتوفاژی را مورد بررسی قرار داده‌اند که به طور خاص یک اندامک ذخیره‌سازی لیپید خنثی، قطرات چربی را هدف قرار می‌دهد تا عملکرد این فرآیند در متابولیسم اسیدهای چرب کبدی را بهتر درک کند [۳].

لیپوفاژی، شکلی از اتوفاژی انتخابی و نوع جدیدی از متابولیسم لیپیدها می‌باشد که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. لیپوفاژی به عنوان تخریب اتوفاژیک قطرات چربی(lipid droplets-LDs) داخل سلولی تعریف می‌شود. اگرچه بسیاری از موارد ناشناخته باقی مانده است، لیپوفاژی نقش مهمی در بسیاری از ارگانیسم ها، انواع سلول‌ها، حالات متابولیک و بیماری‌ها دارد [۴]. لیپوفاژی را می توان از طریق فعال شدن کیناز حساس به استرس AMPK یا مهار کیناز حساس به مواد مغذی mTORC1 در سلول ها القا کرد [۵]. این فرآیند پویا شامل مجموعه ای از مراحل شامل تشخیص LDs داخل سلولی، شروع اتوفاژی و تشکیل اتولیزوزوم است که مستلزم دخالت ژن های مرتبط با اتوفاژی از جمله UNC-51 شبه کیناز – ۱ فعال کننده اتوفاژی (unc-51 like autophagy activating kinase 1-ULK1) است. پروتئین ULK1 نقش کلیدی در القای اتوفاژی در پاسخ به گرسنگی دارد و نشان داده شده است که محل فسفوریلاسیون توسط mTORC1 و AMPK است که به ترتیب تنظیم کننده منفی و مثبت فعالیت ULK1هستند. همچنین برخی مطالعات نشان می دهد که AMPK/SIRT1 به عنوان یک مرکز انرژی در پاسخ به محرومیت از مواد مغذی در نظر گرفته می شود [۶]. پروتئین مرتبط با میکروتوبول ۱ زنجیره سبک ۳ (microtubule-associated protein 1 light chain 3-LC3) یک همولوگ پستانداران از پروتئین ATG8 مخمر است، یک پروتئین شبیه یوبیکوئیتین که لیپید می شود و به شدت با غشای اتوفاگوزومی مرتبط است [۷]. در طی اتوفاژی، LC3 به مولکول فسفاتیدیل اتانول آمین(phosphatidylethanolamine) روی غشای جداسازی به عنوان LC3 لیپید شده (LC3-II)، یک سوبسترای اتوفاژی، توسط کمپلکس ATG12-ATG5-ATG16 پس از برش گلیسین ۱۲۰ [باقیمانده G433ATG] متصل می شود [۵]. با توجه به نقش ULK1 و LC3 در لیپوفاژی کبدی، توجه پژوهشگران به این عوامل مرتبط با لیپوفاژی جلب شده است.

مطالعات نشان داده اند که شرایط محرومیت از مواد غذایی مانند شرایط فستینگ یک سری تغییرات متابولیک و هورمونی هماهنگ برای حفظ تعادل متابولیک ارگانیسم و هموستاز سلولی ایجاد می کند. یکی از تغییرات سلولی که در شرایط فستینگ اتفاق می افتد، فعال شدن اتوفاژی و لیپوفاژی کبدی است، که برای حفظ هموستاز سلولی و تعادل انرژی، کنترل کیفیت، بازسازی سلولی و بافتی، و دفاع در برابر آسیب خارج سلولی و عوامل بیماری زا مهم است [۸]. یکی دیگر از عوامل مرتبط با متابولیسم چربی ها در کبد تمرینات ورزشی است. ورزش می تواند تغییراتی را در ترکیب چربی غشاها ایجاد کند که بر سیالیت و عملکرد سلولی تأثیر می گذارد، همچنین محیط سلولی و گردشی لیپیدها را که آبشارهای سیگنالینگ را تنظیم می کنند، تغییر می دهد [۹]. تحقیقات قبلی نشان داده است که تمرینات ورزشی موجب افزایش لیپولیز و همچنین لیپوفاژی می شود [۱۰, ۱۱]. تغییرات دینامیکی در این حوض‌چه‌های چربی در طول و بعد از ورزش و همچنین عوامل کلیدی که ممکن است مسئول تنظیم تغییرات در اکسیداسیون چربی در پاسخ به شرایط مختلف ورزش باشند، اهمیت دارد [۹].

شواهد جدید نشان می دهد که لیپوفاژی در مهار تجمع LDs نقش دارد. از طرفی مداخلات موثر بر افزایش لیپوفاژی ترویج‌شده با ورزش یا فستینگ در پیشگیری و درمان اختلالات متابولیکی در کبد اهمیت دارد [۱۲]. با توجه به اینکه ULK1 و LC3-II به عنوان عوامل مرتبط با لیپوفاژی کبدی هستند؛ این عوامل کلیدی در لیپوفاژی می توانند اطلاعات مفیدی در خصوص اثر مداخلات مختلف بر متابولیسم لیپید در کبد در اختیار محققیق قرار دهند. با این حال تاکنون تحقیقی که به طور خاص به مقایسه اثر دو روش مداخله تمرینات هوازی و تمرین در شرایط فستینگ بر متغیرهای مرتبط با لیپوفاژی کبدی (بیان ژن های ULK1 و LC3-II) انجام نشده است، که ضرورت تحقیق حاضر را نشان می دهد.

با توجه به مطالب گفته شده، هدف پژوهش حاضر مقایسه اثر تمرینات هوازی در شرایط تغذیه و فستینگ بر بیان ژن عوامل مرتبط با لیپوفاژی در بافت کبد در رت های ویستار نر بود.

روش بررسی

در تحقیق تجربی حاضر، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر ۱۸ هفته ای با میانگین وزن ۳۴۸±۲۵/۵۳ گرم از انستیتو پاستور ایران به عنوان نمونه پژوهش تهیه شدند. پس از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه، به طور تصادفی به ۶ گروه ۵ تایی شامل کنترل، ناشتایی، ناشتایی و ۳ روز تمرین، ناشتایی و ۵ روز تمرین، ۳ روز تمرین، ۵ روز تمرین تقسیم شدند. رت ها در محیطی با میانگین دمای ۱/۴ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴± ۵۵درصد و چرخه روشنایی– تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

مخصوص از جنس پلی کربنات به ارتفاع ۴۳ و طول۲۷ و عرض۲۵ سانتی متر و به تعداد ۲ تا ۳ سر رت در هر قفس در مرکز علوم حیوانات دانشگاه علوم پزشکی گرگان نگهداری شدند. کد اخلاق این پژوهش به شناسه IR.IAU.AK.REC.1399.026 به تصویب دانشگاه آزاد واحد علی آباد کتول رسیده است.

طراحی آزمایش

پروتکل ناشتایی به مدت چهار هفته بود و روزانه به مدت ۱۴ ساعت در زمان چرخه بیداری (۱۷:۳۰ عصرتا ۷:۳۰ صبح) رت ها اعمال گردید. جهت القای ناشتایی، رت های گروهای ناشتایی، همان مقدار معمول غذای نرمال (۱۰ گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن رت) مواد غذایی که بقیه گروه ها درطی ۲۴ ساعت دریافت میکردند را درطی ۱۰ساعت مصرف کردند.

پروتکل تمرین

به منظور آشناسازی و سازگاری با محیط در هفته اول حیوانات به مدت ۱۵ دقیقه روی تریدمیل قرار گرفتند و پس از مرحله آشنایی، تمرین هوازی تداومی را به مدت ۴ هفته به با تواترهای ۳ و ۵ روز درهفته به مدت ۴۵–۶۰ دقیقه روی تردمیل انجام دادند. برنامه تمرینی اصلی رت ها روی تردمیل با شیب صفر درجه با سرعت ۱۴ متر در دقیقه در هفته نخست به سرعت ۱۶و ۱۸متر در دقیقه با شیب صفر درجه در هفته های بعد رسید (جدول ۱) [۱۳].

روش سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی و ژن:

جهت بررسی های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت ها در همه گروه های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده یکتا تجهیز ازما (cat.No:FABRK001 lot.No:K812320822) انجام گرفت. برای این کار، ابتدا ۳۰ میلی گرم از بافت مورد نظراز هر عضوگروه را با ۳۵۰ میکرو لیترازبافر FARB و ۳,۵ میکرو لیتر از بتا –مرکا پتواتانول مخلوط کرده و ترکیب حاصل را به مدت ۳دقیقه ورتکس شد؛ سپس مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و بعد ازفیلترهای موجود در کیت استفاده شد و مخلوط حاصله راداخل فیلتر‌ریخته و با سرعت ۱۳۰۰۰rpm به مدت۳ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع خارج شده از فیلتر جمع آوری شد و داخل میکرو تیوپ های ۱,۵ میلی لیتری ریخته و به اندازه همان اتانول ۷۰ درصد RNAase FREE به آن افزوده شد. سپس مخلوط حاصله به مدت ۳۰ ثانیه ورتیکس شد و بعد از ان میکس مورد نظررا داخل فیلترهایFARB ریخته شد و با سرعت ۱۳۰۰ دور در یک دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله بعد از محلول WASH1 به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به فیلتر اضافه شد و دوباره مخلوط با همان سرعت سانتریفیوژ شد. همین مرحله با محلول WASH2تکرار شد و در انتها به فیلتر ۱۰۰ – ۴۰ میکرو لیتر از آب عادی از RNAase اضافه و به مدت۱ دقیقه با بالاترین دور سانتریفوژ شد که در نتیجه آن RNA از بافت استخراج گردید.

سپس میزان کیفیت، کمیت حاصل از RNA با دستگاه نانو دراپ انـدازه‌گیری شـد و بـه سنتز cdna شـرکت پـارس تـوس مـشهد (parstous.lot:2156,REF:A101161) پرداخته شد. .برای این کار ابتدا میزان۱۰ میکرو لیتر از بافرمیکس کیت را با ۲ لانه از آنزیم کیت مخلوط کرده سپس میزان ۱ نانو گرم الی ۵ میکروگرم خلوص و میزان RNA هر عضو گروه ها مقادیری حدود ۲–۱ میکرو لیتر از RNA به کیس اضافه شد. مخلوط حاصل را تا حجم ۲۰ میکرو لیتر باdepc treated water پر کرده و سپس ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از ان ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه انکوبه گردید و برای توقف، واکنش را ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه قرار داده شد و سپسcDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. اندازه گیری سطوح بیان ژن ULK1 و LC3-II به روش کمی ریل تایم انجام شد.

پرایمرها به روش سایبر گرین SYBER Green qpcr master mix (cat.No: YT2552 ,lot.P2003)و سفارش پرایمرها توسط شرکت پیشگام بیو تک (سنتز آلمان) انجام شد. ژن گلیسرآلدهید -۳-فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر بافرمول 2 -ΔΔCT محاسبه شد. به این صورت که ابتدا سیکل آستانه ژن

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی تداومی

هفته	مرحله۱		مرحله ۲		مرحله۳		مرحله ۴		مرحله ۵		مرحله ۶	
سرعت* و مدت#	سرعت	مدت	سرعت	مدت	سرعت	مدت	سرعت	مدت	سرعت	مدت	سرعت	مدت
سازگاری با محیط	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
آشنایی با تمرین)	۸	۴	۱۰	۸	۵	۳	–	–	–	–	–	–
هفته اول تمرین	۷	۵	۱۰	۵	۱۴	۲۰	۷	۱۰	۴	۵	–	–
هفته دوم تمرین	۸	۷	۱۴	۷	۱۶	۲۵	۱۲	۶	۶	۶	–	–
هفته سوم تمرین	۸	۵	۱۴	۱۰	۱۸	۲۰	۱۴	۱۰	۱۰	۱۰	۵	۵
هفته چهارم تمرین	۸	۵	۱۴	۱۰	۱۸	۲۰	۱۴	۱۰	۱۰	۱۰	۵	۵

*: سرعت بر حسب متر در دقیق؛ مدت بر حسب دقیقه

جدول۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Primer sequence	Nucleotide count
ULK1	For: 5′- GGAGGAGTATCTGATAGGGCAG -3′	20
	Rev: 5′- AACCCGGTGCTCTTTGTCAC -3′	20
LC3	For: 5′- CAGGGCTCCTGGGTAGAACT-3′	23
	Rev: 5′- CTACTCCGTCCAGACTCATGC -3′	24
GAPDH	For: 5′- CACTGAGCATCTCCCTC ACAA-3′	22
	Rev: 5′- TGGTATTCGAGAGA AGGGAGG -3′	22

مورد نظر هر نمونه از سیکل آستانه ژن خانه گردان همان نمونه کم شد. (ΔCt= Ct Target-Ct Housekeeping) در مرحله بعد، عدد به دست آمده از ΔCt هر نمونه را از نمونه های که نسبت به آن نیاز بود مقایسه شود کم کرده و منفی عدد به دست آمده را به توان دو رساندیم و بیان نسبی ژن ULK1 به دست می آمد -ΔΔCt (ΔΔCt=ΔCt Target-ΔCt Reference) E= 2 توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ زیر گزارش شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

در تحقیق حاضر همگی متغیرها به صورت میانگین و انحراف استاندار بیان شده اند. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده ها و همچنین تجانس واریانس ها بین گروه های تحقیق به ترتیب از آزمون های شاپیرو–ویلک و لون استفاده شد. برای مقایسه متغیرهای مورد بررسی در گروه های تحقیق از روش اماری تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد و در صورت معنی داری برای یافتن محل اختلاف از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد و سطح معنی داری (P< ۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته ها

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (جدول ۳) تفاوت معنی داری در بیان ژن LC3-II (P<۰/۰۰۱) و ULK1 مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). با توجه به سطح معنی داری برای یافتن محل اختلاف از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آن در جدول ۴ ارایه شده است.

در بررسی تغیرات بین گروه های نتایج آزمون LSD (جدول ۴–۲) نشان داد که سطح LC3-II در گروه ۵ روز تمرین (P< ۰/۰۱۴)، گرسنگی و ۳ روز تمرین (P< ۰/۰۰۱) و گرسنگی و ۵ روز تمرین(P< ۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل به صورت معنی داری بالاتر بود. همچنین سطح LC3-II در

جدول۳. نتایج ازمون تحلیل واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین گروها

متغیرها	مجموع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	F	P
LC3-II	۲۱۷/۹۰۶	۵	۴۳/۵۸۱	۶/۰۶۱	۰/۰۰۱
	۱۷۲/۵۴۷	۲۴	۷/۱۹۱		
	۳۹۰/۴۸۰	۲۹			
ULK1	۲۲۱/۶۹۹	۵	۴۴/۳۴۰	۵/۹۳۱	۰/۰۰۱
	۱۷۹/۴۲۱	۲۴	۷/۴۷۶		
	۴۰۱/۱۲۰	۲۹			

جدول ۴. نتایج آزمون تعقیبی LSD برای مقایسه میانگینLC3-II و ULK1 در گروهای مداخله سالم

متغیرها	گروه ها	گرسنگی	۳ روز تمرین	۵روزتمرین	گرسنگی و۳ روز تمرین	گرسنگی و ۵روز تمرین
LC3-II	کنترل	۰/۰۸۶	۰/۱۶۳	۰/۰۱۴	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
	گرسنگی		۰/۷۲۶	۰/۳۹۵	۰/۰۰۹	۰/۰۲۷
	۳ روز تمرین			۰/۲۳۴	۰/۰۰۴	/۰۱۲
	۵روزتمرین				۰/۰۵۹	۰/۱۵۰
	گرسنگی و۳ روز تمرین					۰/۶۲۷
ULK1	کنترل	۰/۰۸۶	۰/۱۶۳	۰/۰۱۴	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
	گرسنگی		۰/۷۲۶	۰/۳۹۵	۰/۰۰۹	۰/۰۲۷
	۳ روز تمرین			۰/۲۳۴	۰/۰۰۴	/۰۱۲
	۵روزتمرین				۰/۰۵۹	۰/۱۵۰
	گرسنگی و۳ روز تمرین					۰/۶۲۷

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

گروه های گرسنگی و ۳ روز تمرین (P= ۰/۰۰۹) و گرسنگی و ۵ روز تمرین (P= ۰/۰۲۷) نسبت به گروه گرسنگی به صورت معنی داری بالاتر بود. همچنین سطح LC3-II در گروه های گرسنگی و ۳ روز تمرین (۰/۰۰۱ >P) و گرسنگی و ۵ روز تمرین (۰/۰۰۱ >P) نسبت به گروه های ۳ روز تمرین و ۵ روز تمرین به صورت معنی داری بالاتر بود. همچنین نتایج آزمون LSD (جدول ۴) نشان داد که سطح ULK1 در گروه های ۳ روز تمرین (۰/۰۰۸>P)، ۵ روز تمرین (P= ۰/۰۰۹)، گرسنگی و ۳ روز تمرین (۰/۰۰۱>P) و گرسنگی و ۵ روز تمرین(P= ۰/۰۱۸) نسبت به گروه کنترل به صورت معنی داری بالاتر بود. همچنین سطح ULK1 در گروه های گرسنگی و ۳ روز تمرین (P= ۰/۰۰۹) نسبت به گروه گرسنگی به صورت معنی داری بالا تر بود. همچنین سطح ULK1 در گروه گرسنگی و ۵ روز تمرین (P= ۰/۰۲۹) به صورت معنی داری نسبت به گروه گرسنگی و ۳ روز تمرین پایین تر بود.

بحث

در بررسی اثر پروتکل ناشتایی بر بیان ژن LC3-II ، نتایج تحقیق ما نشان داد که اگرچه ناشتایی موجب افزایش بیان ژن LC3-II کبدی شد با این حال این تغییرات معنی دار نبود. در بررسی اثر ورزش بر بیان ژن LC3-II ، فقط در گروه تمرین با تواتر تمرین ۵ جلسه تمرین در هفته افزایش LC3-II معنی دار بود که این نتایج نشان دهنده نیاز به حجم تمرین مناسب برای تحریک LC3-II به عنوان یک متغیر مرتبط با لیپوفاژی می باشد. همچنین نتایج تحقیق ما نشان داد که در صورت تمرین در شرایط ناشتایی افزایش بیان ژن LC3-II افزایش می یابد نتایج تحقیق دتلفستن(Dethlefsen) و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان می‌دهد که روزه‌داری ۳۶ ساعته بر برخی از واسطه‌های اتوفاژی در ماهیچه‌های اسکلتی انسان تمرین‌نشده تأثیر دارد و وضعیت تمرین بر تأثیر روزه‌داری بر سیگنال‌های اتوفاژی و میانجی‌های اتوفاژی در عضله اسکلتی تأثیر می‌گذارد [۱۴].

در تجزیه و تحلیل وسترن بلات عضله کف پا که توسط اوگاتا(Ogata) و همکاران (۲۰۱۰) که روی موش های صحرایی نر فیشر-۳۴۴ به مدت ۱، ۲ یا ۳ روز در معرض ناشتا قرار گرفته بودند انجام شد نیز نتایج نشان داد که LC3-II، یک پروتئین نشانگر برای ماکرواتوفاژی است و سطح بیان وابسته به مدت زمان ناشتا می باشد. تحقیقات قبلی نیز نشان داده است که تمرینات ورزشی مزمن پروتئین‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندری و پروتئین‌های تغییر دخیل در دینامیک میتوکندری و سیگنال‌دهی اتوفاژی را افزایش دادند، که نشان می‌دهد ورزش می‌تواند باعث بازسازی انطباقی میتوکندری کبد و نوسازی سلول‌های کبدی شود [۱۵]. اهمیت در حال ظهور به تعامل بین بیوژنز میتوکندری، پویایی و اتو(میتو) فاژی یا به طور خاصتر لیپوفاژی در تنظیم انطباق سلولی با استرس ناشی از ورزش نسبت داده شده است [۱۵]. اتوفاژی نقش اساسی در دستیابی به هموستاز بدن بخصوص در بافت های با متابولیسم بالا مانند کبد دارد. یکی از پروتئین‌های اصلی درگیر در این فرآیند، LC3-II است که پس از لیپیداسیون منجر به تشکیل LC3-II می شود که در تشکیل و بلوغ اتوفاگوزوم شرکت می کند. هنگامی که تجمع اندامک های ناکارآمد رخ می دهد، عملکرد مناسب اتوفاژی برای تخریب و آزادسازی مواد مغذی سلول ضروری است [۱۶]. این تجزیه اسیدهای چرب آزاد، اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها را تولید می‌کند که می‌توانند برای سنتز اجزای سلولی جدید یا تولید آدنوزین تری فسفات بازیافت شوند [۱۶]. این فرآیندها به ویژه برای اندام هایی که از نظر متابولیکی بسیار فعال هستند مانند کبد که در سنتز، متابولیسم، ذخیره و توزیع مجدد لیپیدها، کربوهیدرات ها و پروتئین ها شرکت می کند، مهم هستند. تحت شرایط استرس، مانند روزه گرفتن و/یا ورزش بدنی، اتوفاژی/لیپوفاژی در تولید انرژی شرکت می کند [۱۷, ۱۸].

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پروتکل ناشتایی موجب افزایش بیان ژن ULK1 کبدی در موش های مدل NAFLD نسبت به گروه کنترل چرب شد این در حالی بود که در موش ها سالم این افزایش معنی دار نبود. همچنین سازگاری در تغییرات بیان ژن در گروه های مدل کبد چرب غیرالکلی نسبت به موش های سالم نسبت به تمرینات ورزشی متفاوت بود و برخلاف موش‌های سالم در گروه های مدل کبد چرب تغییرات ULK1 نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود. این نتایج نشان دهنده این موضوع است که سازگاری به مداخلات مرتبط با سبک زندگی از جمله ناشتایی یا فعالیت‌های ورزشی می‌تواند تحت تاثیر شرایط مرتبط با سلامت از جمله کبد چرب باشد. در بررسی اثر تعاملی ناشتایی و تمرینات ورزشی در گروه های مدل کبد چرب غیر الکلی نتایج تحیق حاضر نشان دهنده افزایش بیشتر بیان ژن ULK1 در گروه‌های ناشتایی با تواتر تمرین ۳ و ۵ جلسه تمرین در هفته نسبت به گروه کنترل چرب شد. افزایش ULK1 در گروه‌های ۳ و ۵ جلسه تمرین در حالت ناشتایی نسبت به گروه ۵ جلسه تمرین بیشتر بود؛ همچنین افزایش ULK1 در گروه ۵ جلسه تمرین در حالت ناشتایی نسبت به گروه ۳ جلسه در هفته نیز بیشتر بود. که این نتایج نشان دهنده نقش حجم تمرین در حالت ناشتایی بر افزایش ULK1 می باشد. با این حال در گروه های سالم تمرینات در شرایط گرسنگی با تواتر تمرین ۳ جلسه تمرین در هفته نسبت به تمرین در شرایط گرسنگی با تواتر ۵ جلسه تمرین در هفته بر افزایش ULK1 موثرتر بود. مولر و همکاران [۱۹] در تحقیقشان گزارش کردند که ۳۶ ساعت ناشتایی موجب افزایش بیان ژن ULK1 در عضله اسکلتی شد، که با تغییرات ULK1 در گروه ناشتایی نسبت به گروه کنترل متفاوت بود. علت این تفاوت در نتایج ممکن است به خاطر تفاوت در بافت های مورد مطالعه و همچنین تفاوت در میزان مدخله ناشتایی باشد؛ چون در تحقیق مولر مداخله ناشتایی ۳۶ ساعت بود در حالی که در تحقیق حاضر مداخله ناشتایی یک بازه زمانی ۱۴ ساعتی بود. همچنین نتایج تحقیق مولر [۱۹] نشان داد که سیگنال دهی اتوفاژی پس از ۶۰ دقیقه ورزش، مستقل از وضعیت تغذیه ای، در عضله اسکلتی انسان فعال می شود و نشان می دهد که شروع اتوفاژی

یک پاسخ فیزیولوژیکی مهم به ورزش در انسان است. این در حالی بود که در تحقیق حاضر در گروه های تعاملی افزایش بیان ژن ULK1 بخصوص در گروه با تواتر تمرین بیشتر به صورت معنی داری بیشتر از گروه های تمرین در حالت تغذیه شده بود؛ بنابراین می توان گفت که در صورت انجام تمرینات با تواتر تمرینی بیشتر در کبد چرب غیرالکلی به علت افزایش عوامل موثر در لیپوفاژی مانند ULK1، سطح لیپوفاژی بیشتر افزایش می یابد. می توان علت تفاوت در نتایج تحقیق مولر نسبت به تحقیق ما را به تفاوت در نمونه های مورد بررسی و همچنین بافت های مورد مطالعه نسبت داد؛ چون در تحقیق حاضر از بافت کبد استفاده شده شد که بنا به دلایل فیزیولوژیک یک بافت مهم متابولیکی است. گزاش شده است که دویدن حاد روی تردمیل در موش‌ها باعث استرس اکسیداتیو میتوکندری در ۳ تا ۱۲ ساعت و میتوفاژی در ۶ ساعت پس از ورزش در عضله اسکلتی می‌شود که در ارتباط با میتوفاژی ناشی از ورزش و اهمیت سیگنال‌دهی AMPK - ULK1 می باشد [۲۰]. علاوه بر این، اتوفاژی توسط پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات (AMP activated protein kinase -AMPK)، که یک حسگر انرژی کلیدی است و متابولیسم سلولی را برای حفظ هموستاز انرژی تنظیم می‌کند، ترویج می‌شود. برعکس، اتوفاژی توسط هدف پستانداران راپامایسین (mammalian target of rapamycin-mTOR)، یک تنظیم کننده مرکزی رشد سلولی که فاکتور رشد و سیگنال های غذایی را ادغام می کند، مهار می شود [۲۱]. تعداد فزاینده‌ای از شواهد نشان داده‌اند که فعال‌سازی AMPK با کاهش غلظت مالونیل کوآنزیم A، یک مهارکننده کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱، اکسیداسیون اسید چرب را افزایش می‌دهد [۲۲]. تحت ناشتایی گلوکز، AMPK با فعال کردن مستقیم ULK1 از طریق فسفوریلاسیون Ser17 و Ser777 ، اتوفاژی را ترویج می‌کند. تحت کفایت مواد مغذی، فعالیت mTOR بالا با فسفریله کردن ULK1 Ser757 و مختل کردن تعامل بین ULK1 و AMPK از فعال‌سازی ULK1 جلوگیری می‌کند؛ این فسفوریلاسیون هماهنگ برای ULK1 در القای اتوفاژی مهم است [۲۱]. با توجه به اینکه هر دو مدخله ناشتایی و تمرینات ورزشی هر دو موجب فعالسازی AMPK می شوند و از طرفی فعالسازی AMPK موجب سیگنال دهی به ULK1 می شود می توان علت تغییرات بیشتر در بیان ژن ULK1 در گروه تمرین در حالت ناشتایی نسبت به گروه‌های تمرین در حالت تغذیه توجیه کرد. از طرفی در مقایسه روش‌های مداخه در گروه ناشتایی به همراه تواتر تمرین ۵ جلسه در هفته تغییرات ULK1 نسبت به گروه های تمرین بیشتر بود و این تغییرات نسبت به گروه ناشتایی نیز معنی دار بود. می توان افزایش بیشتر ULK1 در این گروه را به عنوان یک سازگاری متابولیکی با هدف لیپولیز بیشتر برای پاسخ به تامین انرژی بیشتر نسبت داد.

مطالعات نشان می دهد که ULK1 کمپلکس آغازین ممکن است از طریق فسفوریلاسیون هدایت شده توسط MTORC1 تنظیم شوند. گزارش شده است که فسفوریلاسیون ULK1 Ser757 توسط MTORC1 با تداخل در ارتباط آن باAMPK ، فعالیت آن را مهار می‌کند. [۲۳]. فعالیت میتوکندری کبد و متابولیسم لیپید را از طریق القای میتوفاژی افزایش می دهد. علاوه بر این، ULK1 می تواند با تنظیم بیان FOXM1 از رشد HCC پشتیبانی کند. ULK1 همچنین از طریق مکانیسم های اتوفاژی و غیر اتوفاژی سمیت و التهاب ناشی از لیپید را کاهش می دهد. همچنین، ULK1 سمیت استامینوفن (APAP) و سنتز کلسترول کبدی را از طریق یک سیگنال دهی مستقل اتوفاژی غیر متعارف افزایش می دهد. برخی تحقیقات نشان دادند که فعالیت بدنی سیگنال دهی اتوفاژیک را از طریق ULK1 در عضله اسکلتی انسان افزایش می دهد [۲۴]. همچنین ورزش فسفوریلاسیون ULK1 را در Ser555 افزایش داده و لیپوژنز را کاهش می‌دهد [۲۵]. برخی مطالعات نیز نشان داده اند که ورزش جسمانی سیگنال‌دهی ULK1 را افزایش می‌دهد و این پاسخ در طول روزه‌داری افزایش می‌یابد [۲۶]. در تحقیق ما نیز بیشترین افزایش ULK1 کبدی در گروهی بود که علاوه بر ناشتایی، بیشترین تواتر تمرین در هفته را نیز داشتند.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمرینات ورزشی موجب افزایش بیان ژن های ULK1 و LC3-II شد همچنین افزایش ULK1 نسبت به تمرینات ورزشی حساستر بود و با تواتر تمرین ۳ جلسه تمرین نیز تغییرات معنی دار بود در حالی که افزایش LC3-II نیاز به تواتر تمرین بالاتر داشت. همچنین نتیج نشان داد که در پروتکل هایی که تمرینات ورزشی در حالت ناشتا انجام شده بود تواتر بیشتر تاثیری بر LC3-II نداشت ولی در تغییرات ULK1 تواتر تمرین ۳ جلسه در هفته نسبت به ۵ جلسه در هفته موثرتر بود. با این حال نیاز به تحقیقات بیشتری برای مکانیسم های مرتبط با تواتر تمرین در حالت ناشتایی بر بیان ژن های مرتبط با لیپوفاژی می باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

در تحقیق حاضر اصول اخلاق کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی آباد کتول تایید شد (R.IAU.AK.REC.1399.026).

حامی مالی

مقاله حاضر حامی مالی ندارد.

مشارکت نویسندگان

ایده و مقاله اولیه: مطهره شبیهی، حبیب اصغرپور؛ اجرای تحقیق و استخراج داده ها: مطهره شبیهی، حبیب اصغرپور، اسرا عسکری.

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافع ندارند.

تشکر و قدردانی

از تمام کسانی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

[1] Jensen-Cody SO, Potthoff MJ. Hepatokines and metabolism: Deciphering communication from the liver. Molecular metabolism. 2021 Feb 1;44:101138. [10.1016/j.molmet.2020.101138] [PMID]

[2] Ghalavand A, Ghobadi MR, Motamedi P, Delaramnasab M. Reduction of fetuin B in adaptation to pyramidal aerobic exercises and its role in modulating insulin resistance and serum aminotransferases in patients with type 2 diabetes. EBNESINA. 2023 Mar 10;25(1):13-20. [Link]

[3] Schulze RJ, Drižytė K, Casey CA, McNiven MA. Hepatic lipophagy: new insights into autophagic catabolism of lipid droplets in the liver. Hepatology communications. 2017 Jul;1(5):359-69. [10.1002/hep4.1056][PMID]

[4] Zhang S, Peng X, Yang S, Li X, Huang M, Wei S, Liu J, He G, Zheng H, Yang L, Li H. The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. Cell Death & Disease. 2022 Feb 8;13(2):132. [10.1038/s41419-022-04593-3][PMID]

[5] Masuda M, Yoshida-Shimizu R, Mori Y, Ohnishi K, Adachi Y, Sakai M, Kabutoya S, Ohminami H, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, Miyazaki M. Sulforaphane induces lipophagy through the activation of AMPK-mTOR-ULK1 pathway signaling in adipocytes. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2022 Aug 1;106:109017. [10.1016/j.jnutbio.2022.109017][PMID]

[6] Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. Essays in biochemistry. 2017 Dec 12;61(6):585-96. [10.1042/EBC20170021][PMID]

[7] Schmitz KJ, Ademi C, Bertram S, Schmid KW, Baba HA. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status. World journal of surgical oncology. 2016 Dec;14(1):1-3.. [10.1186/s12957-016-0946-x][PMID]

[8] Ma YN, Jiang X, Tang W, Song P. Influence of intermittent fasting on autophagy in the liver. BioScience Trends. 2023 Oct 31;17(5):335-55. [10.5582/bst.2023.01207][PMID]

[9] Noland RC. Exercise and regulation of lipid metabolism. Progress in molecular biology and translational science. 2015 Jan 1;135:39-74. [10.1016/bs.pmbts.2015.06.017][PMID]

[10] Li H, Dun Y, Zhang W, You B, Liu Y, Fu S, Qiu L, Cheng J, Ripley-Gonzalez JW, Liu S. Exercise improves lipid droplet metabolism disorder through activation of AMPK-mediated lipophagy in NAFLD. Life sciences. 2021 May 15;273:119314. [10.1016/j.lfs.2021.119314][PMID]

[11] Li R, Li G, Hai Y, Li T, Bian Y, Ma T. The effect of aerobic exercise on the lipophagy of adipose tissue in obese male mice. Chemistry and Physics of Lipids. 2022 Sep 1;247:105225. [10.1016/j.chemphyslip.2022.105225][PMID]

[12] Su P, Chen JG, Tang DH. Exercise against nonalcoholic fatty liver disease: Possible role and mechanism of lipophagy. Life Sciences. 2023 Jun 9:121837. [10.1016/j.lfs.2023.121837][PMID]

[13] Alex S, Boss A, Heerschap A, Kersten S. Exercise training improves liver steatosis in mice. Nutrition & metabolism. 2015 Dec;12(1):1-1. [10.1186/s12986-015-0026-1][PMID]

[14] Dethlefsen MM, Bertholdt L, Gudiksen A, Stankiewicz T, Bangsbo J, van Hall G, Plomgaard P, Pilegaard H. Training state and skeletal muscle autophagy in response to 36 h of fasting. Journal of Applied Physiology. 2018 Nov 1;125(5):1609-19. [10.1152/japplphysiol.01146.2017][PMID]

[15] Santos-Alves E, Marques-Aleixo I, Rizo-Roca D, Torrella JR, Oliveira PJ, Magalhães J, Ascensão A. Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. Life sciences. 2015 Aug 15;135:124-30. [10.1016/j.lfs.2015.06.007][PMID]

[16] Schneider JL, Cuervo AM. Autophagy and human disease: emerging themes. Current opinion in genetics & development. 2014 Jun 1;26:16-23. [10.1016/j.gde.2014.04.003] [PMID]

[17] Vainshtein A, Hood DA. The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle. Journal of Applied Physiology. 2016 Mar 15;120(6):664-73. [10.1152/japplphysiol.00550.2015][PMID]

[18] Bagherniya M, Butler AE, Barreto GE, Sahebkar A. The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. Ageing research reviews. 2018 Nov 1;47:183-97. [10.1016/j.arr.2018.08.004][PMID]

[19] Møller AB, Vendelbo MH, Christensen B, Clasen BF, Bak AM, Jørgensen JO, Møller N, Jessen N. Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. Journal of Applied Physiology. 2015 Apr 15;118(8):971-9. [10.1152/japplphysiol.01116.2014][PMID]

[20] Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, Fisher CC, Zhang M, Saucerman JJ, Goodyear LJ, Kundu M. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. Nature communications. 2017 Sep 15;8(1):548. [10.1038/s41467-017-00520-9][PMID]

[21] Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nature cell biology. 2011 Feb;13(2):132-41. [10.1038/ncb2152][PMID]

[22] Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, Saha AK. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. Acta Physiologica Scandinavica. 2003 Aug;178(4):435-42. [10.1046/j.1365-201X.2003.01164.x][PMID]

[23] Lu Q, Wang PS, Yang L. Golgi-associated Rab GTPases implicated in autophagy. Cell & Bioscience. 2021 Dec;11:1-9. [10.1186/s13578-021-00543-2][PMID]

[24] da Rocha AL, Pinto AP, Bedo BL, Morais GP, Oliveira LC, Carolino RO, Pauli JR, Simabuco FM, de Moura LP, Ropelle ER, Cintra DE. Exercise alters the circadian rhythm of REV-ERB-α and downregulates autophagy-related genes in peripheral and central tissues. Scientific Reports. 2022 Nov 21;12(1):20006. [10.1038/s41598-022-24277-4][PMID]

[25] Zou L, Liao M, Zhen Y, Zhu S, Chen X, Zhang J, Hao Y, Liu B. Autophagy and beyond: Unraveling the complexity of UNC-51-like kinase 1 (ULK1) from biological functions to therapeutic implications. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2022 Oct 1;12(10):3743-82. [10.1016/j.apsb.2022.06.004][PMID]

[26] Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. Current opinion in cell biology. 2010 Apr 1;22(2):132-9. [10.1016/j.ceb.2009.12.004][PMID]