

Research Paper  

The effect of aerobic training on the expression of genes involved in hepatocyte reticulum endoplasmic stress in male rats under high-fat diet

Sara Shahsavari Babokani¹ , Hamid Mohebbi^{1*} 

Received: February 09, 2024

Revised: June 10, 2024

Accepted: June 30, 2024

ABSTRACT

Objective: This study was conducted to determine the influence of nutrition and aerobic exercise on the signaling pathway of ER stress in the liver.

Methodology: A total of 18 male wistar rats, aged 5 weeks and weighing approximately 167 grams, were randomly divided into three groups: normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and high-fat diet with aerobic exercise (HFD+EX). The rats in the HFD+EX group underwent exercise training three times per week for 12 weeks with an intensity of 68-80% of their maximum aerobic velocity. After completing the training, liver tissue samples were collected from all rats to measure the expression changes of Chop, Atf6, Perk, and Bax genes, as well as liver fat accumulation. Data analysis was conducted using the one-way ANOVA test.

Results: Higher liver fat content and higher expression of Chop, Atf6, Perk, and Bax, was observed in the HFD rats. In the HFD+EX group, liver fat content, Chop and Perk gene expression were lower than in the HFD group. In the HFD+EX group reduction of Atf6 and Bax genes, was not statistically significant ($p > 0.05$).

Conclusion: High fat diet can activate the unfolded protein response (UPR) pathway by elevating ER stress. This can lead to high expression of the Bax gene in liver cells. However, regular exercise can be an effective way to prevent the accumulation of liver fat by reducing UPR activation. This is due to its potential to lower the expression of Chop, Atf6, and Perk gene.

Keywords: Fatty Liver, Diet, Apoptosis, Unfolded Protein Response, Exercise.

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

* Corresponding author's e-mail address: mohebbi@guilan.ac.ir

Cite this article: Shahsavari Babokani, S., Mohebi, H., (2025). The effect of aerobic training on the expression of genes involved in hepatocyte reticulum endoplasmic stress in male rats under high-fat diet. *Journal of Metabolism and Exercise*, 15 (1), 1-18.

DOI: <https://doi.org/10.22124/jme.2024.26460.349>

Extended Abstract

Introduction and State of Problem

Obesity and high-fat diets (HFD) are primary drivers of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), a growing global health crisis (1). While the pathophysiology is multifactorial, emerging evidence highlights a critical role for endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in hepatocyte dysfunction, steatosis, and apoptosis (2). Chronic nutrient excess disrupts ER homeostasis, activating pro-apoptotic pathways, including the PERK-eIF2 α -CHOP axis, and upregulating pro-apoptotic factors like Bax (3). Physical exercise is a cornerstone of NAFLD management, yet the molecular mechanisms by which aerobic training mitigates hepatic ER stress and its downstream consequences remain incompletely understood (4). This study therefore investigated the effects of a 12-week aerobic training program on the expression of key ER stress-related genes (Chop, Atf6, Perk) and the pro-apoptotic gene Bax in the liver of male rats fed a high-fat diet.

Methodology

Animals and experimental design

Eighteen male Wistar rats (aged 5–6 weeks; initial body weight: 167 ± 12 g) were obtained from the Razi Institute and housed under standard conditions. After one week of acclimatization, animals were randomly divided into three groups ($n=6$ per group): (1) normal diet (ND), (2) high-fat diet (HFD), and (3) high-fat diet plus aerobic exercise (HFD+EX). The HFD provided 60% of calories from fat, while the ND provided 10%. All rats had free access to food and water throughout the 12-week study period.

Exercise protocol

The HFD+EX group performed progressive aerobic training on a motorized treadmill, three sessions per week for 12 weeks, at 0° inclination. Exercise intensity was individually determined based on the maximal aerobic velocity (MAV). Training began at 68% of MAV and gradually increased to 80% of MAV by the fifth week, with running time progressively increased thereafter.

Tissue and blood collection

Forty-eight hours after the last exercise session to avoid acute effects, rats were anesthetized with ketamine (30 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg). Liver tissue was rapidly excised, washed with saline, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for subsequent molecular analysis.

Gene expression analysis

Total RNA was extracted from liver tissue using RNX-Plus reagent. RNA quantity and quality were assessed by spectrophotometry (NanoDrop) and 1% agarose gel electrophoresis. cDNA was synthesized using a commercial kit. Real-time PCR was performed to measure mRNA expression of Chop, Atf6, Perk, and Bax, with Gapdh as the housekeeping gene. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

Histological and statistical analysis

Liver fat content was evaluated using Oil Red O staining. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (or Welch's ANOVA when appropriate). Statistical significance was set at $p < 0.05$.



Results

Body weight and liver fat content

Over the 12-week intervention, body weight increased in all groups. However, HFD feeding resulted in significantly greater weight gain compared to the ND group ($p < 0.05$). The HFD group weighed approximately 24% more than the ND group, while the HFD+EX group showed an 11% increase relative to ND.

Liver fat content, assessed by Oil Red O staining, was markedly higher in HFD-fed rats. Specifically, the HFD group exhibited approximately 10-fold greater hepatic lipid accumulation compared to the ND group ($p < 0.001$). Importantly, aerobic training significantly attenuated this effect; liver fat content in the HFD+EX group was only 3.48-fold higher than that in the ND group ($p < 0.05$), representing a substantial reduction compared to the HFD group.

Gene expression of ER stress markers

HFD feeding dramatically upregulated the expression of key ER stress-related genes. Chop mRNA expression was 7-fold higher in the HFD group relative to the ND group ($p < 0.001$). In the HFD+EX group, Chop expression was 3.49-fold higher than ND, indicating a partial but incomplete attenuation by exercise. Effect size and power for Chop were 1.17 and 0.917, respectively. Atf6 expression increased 4.66-fold in the HFD group compared to ND ($p < 0.01$). Although the HFD+EX group showed lower Atf6 expression than the HFD group (3.89-fold vs. ND), this reduction did not reach statistical significance ($p > 0.05$). Effect size and power for Atf6 were 1.07 and 0.861.

Perk expression was elevated 5.38-fold in the HFD group versus ND ($p < 0.001$). Aerobic training significantly reduced Perk expression in the HFD+EX group compared to the HFD group ($p < 0.05$), with an effect size of 1.15 and power of 0.905.

Bax gene expression

The pro-apoptotic gene Bax showed a 6.20-fold increase in the HFD group relative to ND ($p < 0.001$). In the HFD+EX group, Bax expression was 3.85-fold higher than ND. Although this represents a lower value than in the HFD group, the difference between HFD and HFD+EX was not statistically significant ($p > 0.05$). Effect size and power for Bax were 1.16 and 0.915, respectively.

Discussion and Conclusion

The present study investigated the effects of 12 weeks of aerobic training on hepatic ER stress markers and apoptosis in male rats fed a high-fat diet. Our key findings demonstrate that HFD feeding induces significant hepatic steatosis, upregulates ER stress-related genes (Chop, Atf6, Perk), and increases the pro-apoptotic gene Bax. Importantly, aerobic exercise partially attenuated these effects, particularly reducing liver fat content and Chop and Perk expression.

Our observation that HFD feeding increased hepatic lipid accumulation is consistent with previous reports linking sedentary lifestyle and high-caloric diets to NAFLD pathogenesis. The liver is structurally rich in ER, which comprises approximately 50% of total cellular membranes. ER stress is recognized as a critical factor in NAFLD development (4). When ER homeostasis is disrupted by excessive free fatty acids and cholesterol, the unfolded protein response (UPR) is activated to restore balance. However, prolonged or severe ER stress can shift cellular responses from protective to pathological, promoting steatosis, insulin resistance, inflammation, and apoptosis. In our study, HFD feeding upregulated Perk, Atf6, and Chop

expression, accompanied by increased Bax. This aligns with the well-established PERK-eIF2 α -CHOP pathway, where sustained ER stress triggers pro-apoptotic signaling. Tanaka and colleagues similarly reported simultaneous activation of IRE1/JNK and PERK/ATF4/CHOP pathways in livers of HFD-fed mice (6). Excessive free fatty acids increase mitochondrial-dependent apoptosis by upregulating Bax synthesis, leading to cytochrome c release and caspase activation. Thus, our data support the “two-hit” hypothesis of NAFLD, where insulin resistance and obesity (first hit) prime the liver, and ER stress-mediated apoptosis (second hit) drives disease progression.

Our finding that aerobic training reduced hepatic fat content is clinically significant. The HFD+EX group showed only 3.48-fold higher liver fat versus ND, compared to 10-fold in the HFD group. This reduction occurred alongside decreased Chop and Perk expression. Meta-analytic evidence indicates that regular exercise reduces hepatic steatosis by 20–30%, independent of weight loss. Exercise may improve ER folding capacity or reduce protein misfolding burden, thereby lowering UPR activation.

Cheng and colleagues demonstrated that exercise suppressed HFD-induced increases in Perk, p-EIF2 α , and Chop in muscle tissue. Chronic aerobic training appears to enhance ER adaptive capacity, preventing the transition from adaptive UPR to apoptotic signaling. Hong and colleagues reported that 16 weeks of regular exercise mitigated ER stress-induced endothelial dysfunction in diabetic mice (5). However, the precise molecular mechanisms remain incompletely understood and warrant further investigation.

Exercise effects on Bax and apoptosis

Although Bax expression trended lower in HFD+EX compared to HFD, this reduction was not statistically significant. This suggests that while exercise partially ameliorates ER stress, complete normalization of apoptotic signaling may require longer intervention or combination with dietary modification. Ruan and colleagues reported that exercise intensity differentially modulates hepatocyte apoptosis through IRE1/JNK and eIF2 α /CHOP pathways.

Conclusion

In conclusion, aerobic exercise serves as an effective non-pharmacological strategy to mitigate HFD-induced hepatic ER stress and steatosis, primarily through downregulation of Chop and Perk. These findings provide mechanistic insight into the hepatoprotective effects of regular physical activity.

Originality/Value

It will be suggested that future studies investigate the effects of different aerobic training intensities and its time course on the expression of key genes involved in the endoplasmic reticulum stress pathway and hepatic apoptosis, in order to determine the optimal exercise dose for maximal protective effects against high-fat diet-induced fatty liver.

Research Limitations/Implications

The lack of detailed investigation into the molecular mechanisms distinguishing mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in the induction of apoptosis, as well as insufficient knowledge regarding the effects of different exercise intensities and volumes on endoplasmic reticulum stress responses, are among the most important limitations of the present study.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was conducted in full compliance with the ethical principles governing animal research and in accordance with the approved guidelines of the Ethics Committee in Research of the university under

ethics code IR.SSRI.REC.1401.1519.

Funding

This research received no direct financial support from any public, private, or non-profit organizations or institutions.

Authors' contribution

The authors jointly collaborated on the conception and design of the study, data collection, analysis of the findings, and the writing of the initial and final versions of the manuscript.

Conflict of interest

The authors hereby declare that there is no conflict of interest whatsoever in this article.

Acknowledgments

This article is derived from the doctoral dissertation of the University of Guilan. The authors hereby express their gratitude and appreciation to all those who collaborated in this research.

References

1. Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. (2017). Prevalence of obesity among adults and youth: United states, 2015-2016. NCHS Data Brief. (288):1-8.
2. Hotamisligil GS. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell.140(6):900-17 .
3. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science.306(5695):457-61.
4. Flessa CM, Kyrou I, Nasiri-Ansari N, Kaltsas G, Papavassiliou AG, Kassi E, Randeva HS. (2021). Endoplasmic reticulum stress and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (nafld): Current evidence and perspectives. Curr Obes Rep.10(2):134-61.
5. Hong J, Park E, Lee J, Lee Y, Rooney BV, Park Y. (2021). Exercise training mitigates er stress and ucp2 deficiency-associated coronary vascular dysfunction in atherosclerosis. Scientific reports.11(1):15449.
6. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, et al. (2016). Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. Hepatology.64(6):1994-2014.

اثر تمرین هوازی بر بیان ژن های درگیر در استرس شبکه اندوپلاسمیک کبد رت های نر تحت رژیم غذایی پرچرب

سارا شهسواری بابوکانی¹، حمید محبی^{1*}

تاریخ پذیرش: 1403/04/10

تاریخ بازنگری: 1403/03/21

تاریخ دریافت: 1402/11/20

چکیده

هدف: هدف مطالعه حاضر بررسی اثر تغذیه و تمرین هوازی بر مسیر پیام‌رسانی استرس ER کبد بود.

روش‌شناسی: 18 سر رت نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 167 گرم و سن تقریبی 5 هفته به صورت تصادفی در گروه‌های رژیم غذایی طبیعی (ND)، رژیم غذایی پرچرب (HFD) و رژیم غذایی پرچرب و تمرین هوازی (HFD+EX) قرار گرفتند. مداخله تمرینی با شدتی حدود 70-80 درصد حداکثر سرعت هوازی 3 جلسه در هفته به مدت 12 هفته اجرا شد. در پایان، نمونه‌های بافت کبد برای اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن‌های *Chop*، *Atf6*، *Perk* و *Bax* و تجمع چربی کبد جمع‌آوری شدند. تحلیل داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه انجام شد.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های *Chop*، *Atf6*، *Perk* و *Bax* در کبد رت‌های گروه HFD مشاهده شد که بیان بالاتر این ژن‌ها با محتوای چربی کبد بالاتر همراه بود. محتوای چربی کبد و بیان ژن *Chop* و *Perk* در گروه HFD+EX در مقایسه با گروه HFD کمتر بود ($p < 0/05$) اما بیان ژن‌های *Atf6* و *Bax* در گروه HFD+EX در مقایسه با گروه HFD از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

نتیجه‌گیری: احتمالاً رژیم غذایی پرچرب از طریق افزایش استرس ER سبب راه‌اندازی مسیر پاسخ پروتئین‌های تا نخورده (UPR) می‌گردد. به دلیل بالا بودن استرس ER در سلول‌های کبد رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب بیان ژن *Bax* نیز بالاتر بود. به نظر می‌رسد تمرین به‌واسطه کاهش UPR از طریق تمایل به کمتر بودن بیان ژن‌های *Chop*، *Atf6* و *Perk* مکانیسم مؤثری در جلوگیری از تجمع چربی کبد محسوب شود.

واژه‌های کلیدی: کبد چرب، رژیم غذایی، آپوپتوز، پاسخ پروتئین‌های تا نخورده، تمرین هوازی.

1. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نشانی الکترونیک نویسنده مسئول: mohebbi@guilan.ac.ir

استناد: شهسواری بابوکانی، سارا؛ محبی، حمید. (1404). اثر تمرین هوازی بر بیان ژن های درگیر در استرس شبکه اندوپلاسمیک کبد رت-

های نر تحت رژیم غذایی پرچرب. نشریه سوخت و ساز و فعالیت ورزشی، 15 (1)، 18 - 1

DOI: <https://doi.org/10.22124/jme.2024.26460.349>

نوآوری پژوهش و پیام کلی

این مطالعه در بررسی همزمان اثر تمرین هوازی بر بیان ژن‌های کلیدی هر سه مسیر اصلی پاسخ به پروتئین‌های ناتاشده (UPR) شامل *Chop*، *Atf6* و *Perk* به همراه ژن پروآپوپتوتیک *Bax* در کبد رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب است. یافته‌ها نشان داد که رژیم غذایی پرچرب از طریق افزایش استرس شبکه اندوپلاسمی و فعال‌سازی این مسیرها، منجر به تجمع چربی و افزایش آپوپتوز کبدی می‌شود. در مقابل، تمرین هوازی منظم می‌تواند به عنوان یک



راهکار مؤثر غیردارویی، با کاهش نسبی بیان ژن‌های درگیر (به ویژه Chop و Perk) از تجمع چربی کبدی جلوگیری کرده و اثر محافظتی بر کبد اعمال نماید.

مقدمه

چاقی یک بحران بهداشت عمومی محسوب می‌شود که حدود 39 درصد از بزرگسالان را در کشورهای پیشرفته تحت تأثیر قرار داده است (16). به طوری که BMI بالا عامل مرگ بسیاری از افراد در سراسر جهان است (1). با افزایش BMI و دور کمر شیوع کبد چرب غیرالکلی¹ (NAFLD) نیز افزایش می‌یابد. به دلیل ارتباط نزدیک بین NAFLD و چاقی، نقش کالری مازاد دریافتی در NAFLD برجسته می‌شود. مدیریت انرژی و مواد مغذی دریافتی در موجودات زنده نیاز به عملکرد منظم و هماهنگ بسیاری از سیستم‌های همئوستاتیک در سطح سلول و بافت دارد. بخش بزرگی از توسعه و تکامل این سیستم‌های همئوستاتیک در غیاب فشارهایی که ما اکنون به‌عنوان انسان مدرن تجربه می‌کنیم (دریافت مواد مغذی اضافی، اجزای جدید در رژیم‌های غذایی، کمبود فعالیت بدنی و افزایش طول عمر)، رخ داده است. به نظر می‌رسد در صورت مزمن شدن این چالش‌ها پاسخ‌های بیولوژیکی قادر به مقابله با آن نباشند (23) و این سیستم‌های همئوستاتیک روبه‌زوال می‌روند. این روند مجموعه‌ای از شرایط پاتولوژیکی نظیر بیماری‌های متابولیکی، به‌ویژه چاقی و دیابت نوع 2 را سبب می‌شود که در سال‌های اخیر به‌طور چشمگیری در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه، افزایش یافته است (22).

چاقی و تجمع چربی بیش از حد نفوذ ماکروفاژها و افزایش التهاب را به دنبال دارند؛ التهاب و استرس شبکه رتیکولوم اندوپلاسمیک² (ER) در کوتاه‌مدت برای عملکرد و بقای سلول ضروری هستند، اما زمانی که مزمن می‌شوند سبب تخریب در عملکرد سلولی می‌شوند (16). مطالعات اخیر نشان می‌دهند چاقی عملکرد ER در سلول‌های کبدی را به خطر می‌اندازد (25) و منجر به مقاومت به انسولین و دیابت نوع 2 می‌شود. افزایش عملکرد ER سلول‌های کبدی در موش‌های ترا ریخته یا با استفاده از چاپرون‌های شیمیایی از مقاومت به انسولین ناشی از رژیم غذایی پرچرب جلوگیری می‌کند (39). بنابراین، استرس ER و مسیرهای پیام‌رسانی آن، مکانیسمی حیاتی در پاسخ‌های التهابی ناشی از چاقی و مقاومت به انسولین است.

استرس ER ناشی از عدم تعادل میان نیاز به تا خوردن صحیح پروتئین‌های تازه سنتز شده و ظرفیت اندامک برای انجام این کار است. بر این اساس، فعال‌سازی UPR استرس ER را با مکانیسم‌های رونویسی و غیر رونویسی کاهش می‌دهد که در مجموع، بار پروتئین را کاهش و توانایی اندامک را برای تا کردن، انتقال یا تجزیه پروتئین‌ها افزایش می‌دهد (10). انباشته شدن پروتئین‌های تا نخورده یا بد تاخورد در لومن ER، مجموعه‌ای از مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی را فعال می‌کند که به نام پاسخ پروتئین‌های تا نخورده³ (UPR) شناخته می‌شوند. گرچه UPR در ابتدا برای حفظ هموستاز پروتئین در ER شناسایی شد، اما در ادامه مطالعات نشان دادند UPR نقش اساسی در حفظ هموستاز و متابولیسم لیپید ایفا می‌کند (10)؛ بنابراین فعال‌سازی UPR پیامدهای مهمی در سنتز لیپید و استرول-ها دارد. عوامل استرس‌زای مختلفی مانند عوامل بیوشیمیایی، پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی سبب برهم خوردن هموستاز

¹ Nonalcoholic fatty liver disease

² Endoplasmic Reticulum

³ Unfolded Protein Response



درون ER می‌شوند (37). احتمالاً میزان و مدت استرس ER می‌تواند بر بقا و مرگ سلولی اثرات متفاوت داشته باشد (47). هنگامی که سلول‌ها دچار استرس ER می‌شوند، UPR فعال می‌شود، این عمل دو نتیجه متضاد را به همراه دارد. از یک طرف، سلول‌هایی که استرس ER کوتاه‌مدت را تجربه می‌کنند، توانایی ER را برای پردازش پروتئین‌ها از طریق UPR و بازگرداندن هموستاز ER به حالت فیزیولوژیکی نشان می‌دهند و به سلول‌ها اجازه زنده ماندن می‌دهند. از سوی دیگر، سلول‌هایی که استرس ER شدید را تجربه می‌کنند، معمولاً از طریق مسیرهای متعدد سبب مرگ سلولی شده و به شدت به بدن آسیب می‌رسانند (26).

مطالعات مختلف نشان می‌دهند رژیم‌های غذایی پرچرب سبب افزایش استرس ER در کبد موش‌های می‌شود (38). (43). در مقابل شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهند اجرای فعالیت ورزشی هوازی با کاهش استرس ER در عضلات موش‌ها همراه است (6).

در پژوهش دیگر نشان داده شده تمرین هوازی با افزایش استرس ER در هیپوتالاموس، هیپوکامپ و قشر مغز موش‌ها مرتبط بود (28). نکته جالب این که علی‌رغم افزایش افزایش پاسخ UPR در پاسخ به ورزش، سیگنال‌های آپوپتوز را القا نکرد (28). این طور به نظر می‌رسد استرس ER به عنوان یک رویداد تعیین‌کننده سرنوشت سلول در نظر گرفته می‌شود. اگر سلول‌ها قادر به جبران محرک‌های خارجی شدید نباشند، آپوپتوز سلولی توسط استرس ER القا می‌شود. اگر محرک‌ها خفیف باشند، اتوفژی ناشی از استرس ER برای حفظ بقای سلولی با فراهم کردن مواد مغذی از طریق هضم اندامک‌ها و پروتئین‌های آسیب دیده خود القا می‌شود. این مکانیسم پیچیده ثبات هموستاز درون سلول و پاسخ‌های محافظتی به محرک‌های خارجی را تقویت می‌کند (32).

آنجایی که سلول‌های پستانداران مسیر پیام‌رسانی پیچیده‌ای از ER به سیتوزول و هسته را ایجاد کرده‌اند هرگونه اختلال در هموستاز ER بروز بیماری‌های متابولیکی را به همراه دارد؛ بنابراین هدف قرار دادن مسیرهای پیام‌رسانی خاص UPR برای کاهش استرس ER و فعال‌سازی UPR فرصت‌هایی را برای توسعه استراتژی‌های درمانی جدید در طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها فراهم می‌کند. در میان رویکردهای غیر دارویی، سازگاری‌های ناشی از تمرین بدنی به‌طور هم‌زمان سیستم‌های مختلف را درگیر می‌کند و سبب بهبود ارتباط متقابل بین اندام‌ها برای کاهش اختلالات مرتبط با NAFLD می‌شود (45). علی‌رغم نقش پذیرفته‌شده تمرین فعالیت‌های ورزشی بر بهبود برخی بیماری‌های متابولیکی مطالعات کمی تأثیر تمرین فعالیت ورزشی بر استرس ER را مورد مطالعه قرار داده‌اند و مکانیسم‌های بیولوژیکی زیربنایی اثر ورزش بر NAFLD هنوز به‌خوبی شناخته‌نشده است؛ بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی اثر تمرین هوازی بر استرس شبکه اندوپلاسمیک رت‌های نر تحت رژیم غذایی پرچرب بود.

روش‌شناسی

حجم نمونه این مطالعه بر اساس نتایج تحقیقات پیشین (14) و به دست آوردن E، (تعداد کل گروه‌ها) - (تعداد کل واحدهای آزمون) = E، زمانی که تعداد رت‌ها در سه گروه را شش سر رت در نظر بگیریم آنگاه E برابر 15 خواهد شد که نشان می‌دهد توان آماری برای این تعداد بالا است و ملاحظات اخلاقی مبنی بر استفاده بی‌دلیل از تعداد زیاد حیوانات نیز رعایت شده است (11). رت نر نژاد ویستار با سن تقریبی 5-6 هفته و میانگین وزن 167 ± 12 گرم



به‌عنوان نمونه از موسسه سرم‌سازی رازی خریداری و مطابق با دستورالعمل‌های انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی به آزمایشگاه جوندگان دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان منتقل شدند. پس از سازگاری با شرایط محیطی، رت‌ها به‌صورت تصادفی در سه گروه **ND**: رت‌های تحت رژیم غذایی نرمال (10 درصد کالری چربی، 70 درصد کالری کربوهیدرات، 20 درصد کالری پروتئین)، **HFD**: رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب (60 درصد کالری چربی، 20 درصد کالری کربوهیدرات، 20 درصد کالری پروتئین) (**HFD+EX** (27): رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب و تمرین هوازی قرار گرفتند. تمرین هوازی به‌صورت منظم به مدت 12 هفته و سه جلسه در هفته انجام شد. در طی 12 هفته دو گروه دیگر هیچ نوع فعالیت ورزشی نداشتند. دسترسی به آب و غذا در طول مدت مطالعه به‌صورت آزادانه بود. این مقاله بخشی از پژوهش مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشگاه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی با کد اخلاق **IR.SSRI.REC.1401.1519** بود.

شدت فعالیت ورزشی با آزمون حداکثر سرعت هوازی¹ (**MAV**) تعیین شد. بدین منظور پس از گرم کردن سرعت نوار گردان به 10 متر در دقیقه افزایش یافت و پس‌از آن هر سه دقیقه 5 متر در دقیقه به‌سرعت نوار گردان اضافه می‌شد و این پروتکل تا رسیدن به ناتوانی در دویدن (8) علی‌رغم 10 ثانیه شوک الکتریکی ادامه یافت (13). پروتکل سه روز در هفته، به مدت 12 هفته و به‌صورت پیش‌رونده با شیب 0 درجه اجرا شد. این پروتکل با 68٪ حداکثر سرعت آغاز و در هفته پنجم به 80٪ رسید و پس‌از آن با حفظ سرعت زمان تمرین به‌صورت پیش‌رونده تا پایان هفته دوازدهم افزایش یافت (2).

روش جمع‌آوری نمونه‌های سرمی و بافتی استخراج

جمع‌آوری و بافت‌برداری نمونه‌ها در پایان هفته دوازدهم تمرین انجام شد. چهل‌وهشت ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرین و به منظور از بین بردن اثرات حاد تمرین، رت‌ها با تزریق 30 میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین 10 درصد و 4 میلی‌گرم در کیلوگرم زایلازین 2 درصد درون صفاقی بی‌هوش شدند (46). پس از اطمینان از بیهوشی با برش در ناحیه شکم و قفسه سینه مقدار 10 میلی‌لیتر خون از سیاهرگ اجوف گرفته شد. در ادامه بافت کبد سریعاً جدا شد و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی در میکروتیوب‌های فاقد **RNAase** و **DNAase** به منظور جلوگیری از هرگونه آلودگی قرار داده شد. در ادامه بافت‌ها در تانک نیتروژن مایع منجمد شدند.

RNA و رونویسی معکوس **Real Time-PCR**

استخراج **RNA** از بافت کبد به روش غیر ستونی 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 اسپکتروفوتومتر (**NanoDrop One C, Thermo Scientific, USA**) و کیفیت آن از طریق الکتروفورز ژل آگارز 1 درصد بررسی شد (شکل 2). 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 1). 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 **Real-Time PCR (Rotorgene Q, Qiagen, USA)** به‌صورت واسرشته سازی اولیه در دمای 95 درجه به مدت سه دقیقه، 40 سیکل تکثیر با واسرشته سازی در دمای 95 درجه به

¹ Maximal Aerobic Velocity



مدت 30 ثانیه، دمای اختصاصی اتصال آغازگر به مدت 20 ثانیه، تکثیر در دمای 72 درجه به مدت 30 ثانیه و در انتها محاسبه نقطه ذوب محصولات از دمای 65 تا 95 درجه تنظیم شد. کارایی تکثیر برای هر آغازگر به صورت جداگانه محاسبه و کارایی بین 90 تا 110 برای محاسبه بیان هر ژن مطلوب در نظر گرفته شد. برای محاسبه بیان ژن از معادله $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد (33).

جدول 1 مشخصات و توالی آغازگرهای استفاده شده در پژوهش

ژن	توالی آغازگرها
<i>Chop</i>	F TACTCTTGACCCTGCATCCC R ACTGACCACTCTGTTTCCGT
<i>Perk</i>	F AGTCGGTCTTTCTCAGTGGG R CCATGTCGCAATCTGTCAGG
<i>Atf6</i>	F AGCCCCTCATTAACACGACA R AGAATTCGAGCCCTGTTCCA
<i>Bax</i>	F AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT R CCAGTTGAAGTTGCCGTCTG
<i>Gapdh</i>	F GACATGCCGCCTGGAGAAAC R AGCCAGGATGCCCTTTAGT

روش های تحلیل آماری

پس از جمع آوری داده ها، تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS نسخه 27 انجام شد. طبیعی بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو - ویلک¹ و همگنی واریانس ها با استفاده از آزمون لوین² مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه، برای مقایسه تغییرات بین گروهی از آزمون تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی³ و در شرایطی که واریانس-ها همگن نبودند از آزمون تحلیل واریانس ولچ⁴ در سطح معنی داری $p \leq 0/05$ استفاده شد.

¹ Shapiro-Wilk

² Levene

³ Tukey

⁴ Welch

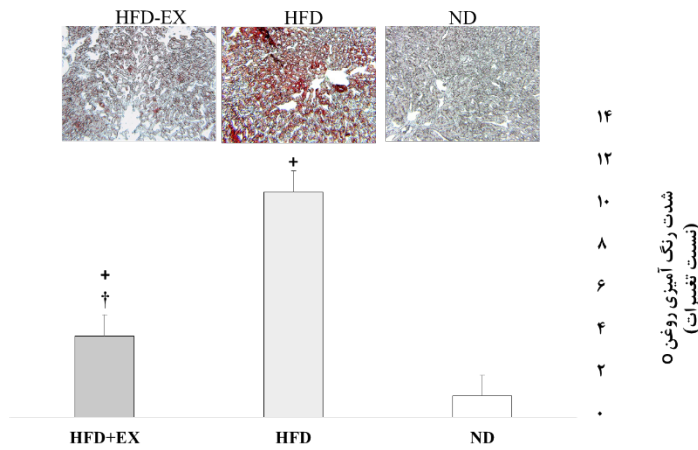


یافته‌ها

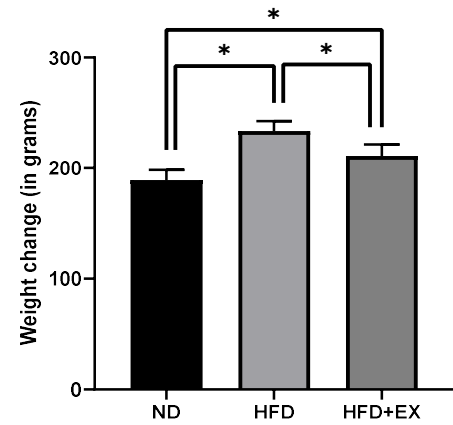
با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Oil Red مطابق نمودار 1 مشخص شد، محتوای چربی کبد رت‌های در گروه‌های دارای رژیم غذایی پرچرب نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بود. محتوای چربی کبد در گروه HFD حدود 10 برابر نسبت به گروه ND بیشتر بود ($p < 0/001$). در گروه HFD+EX محتوای چربی کبد نسبت به گروه HFD کمتر بود. به شکلی که در گروه HFD+EX محتوای چربی کبد تنها 3/48 برابر گروه ND بود ($p < 0/05$).

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک راهه نشان می‌دهد وزن رت‌ها در همه گروه‌ها افزایش یافت. این در حالی است که رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش معنی‌دار وزن گروه‌های HFD و HFD+EX نسبت به گروه ND شد. به طوری که وزن گروه HFD در حدود $24 \pm 0/04$ درصد بیشتر از گروه ND بود. میزان افزایش در گروه HFD+EX به ترتیب $11 \pm 0/05$ درصد بیشتر از گروه ND بود.

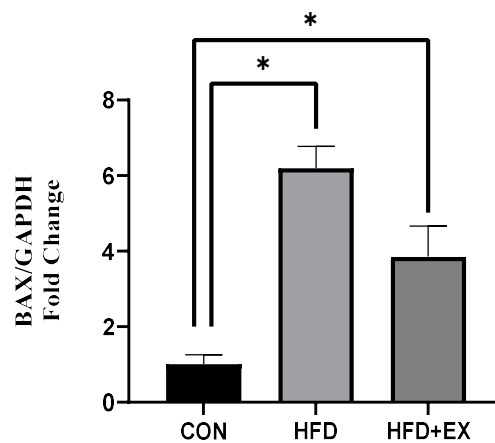
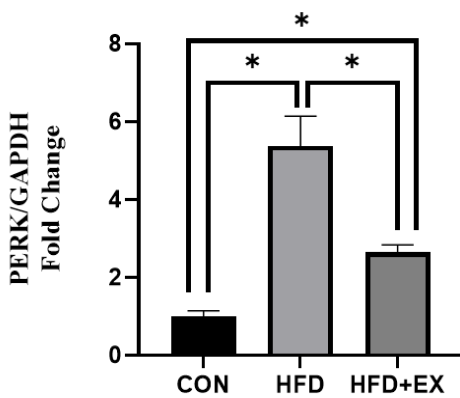
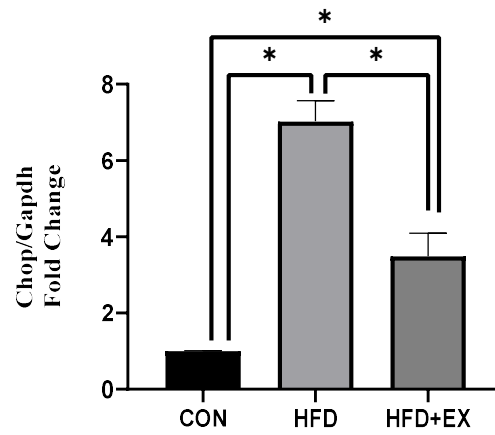
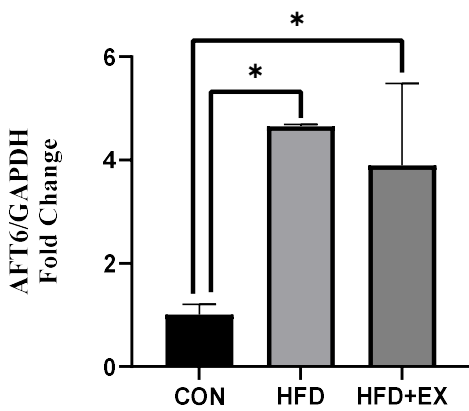
بر اساس نتایج حاصل از کمی‌سازی نسبی با روش $\Delta\Delta ct$ ، بیان ژن *Chop* کبد رت‌ها در گروه HFD 7 برابر نسبت به گروه ND بالاتر بود ($p < 0/001$) اما در گروه HFD+EX میزان بیان *Chop* 3/49 برابر نسبت به گروه ND بالاتر بود ($p < 0/05$). بیان 4/66 برابری ژن *Aft6* در گروه HFD در مقایسه با ND مشاهده شد ($p > 0/01$). اندازه اثر و توان آزمون در مقادیر بدست آمده از بیان ژن *Chop* به ترتیب 1/17 و 0/917 بود. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد اندازه اثر و توان آزمون در مقادیر بدست آمده از بیان ژن *Aft6* به ترتیب 1/07 و 0/861 بودند. میزان بیان ژن *Aft6* در گروه HFD+EX نسبت به گروه ND 3/89 برابر بالاتر بود. اگرچه بیان ژن *Aft6* در گروه HFD+EX نسبت به گروه HFD کمتر بود اما این میزان در سطح معنی‌داری قرار نداشت ($p > 0/05$). نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد اندازه اثر و توان آزمون در مقادیر بدست آمده از بیان ژن *Perk* بالا بود این مقادیر به ترتیب 1/15 و 0/905 بالا بودند. بیان ژن *Perk* در کبد رت‌های گروه HFD نسبت به گروه ND 5/38 برابر بالاتر بود ($p < 0/001$). بیان این ژن در گروه HFD+EX نسبت به گروه HFD به میزان 2/64 بیان بالاتری را نشان داد. بیان ژن *Perk* در گروه HFD+EX نسبت به گروه HFD به طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0/05$). بیان ژن BAX در کبد رت‌های گروه HFD 6/20 برابر نسبت به گروه ND بالاتر بود ($p < 0/001$). در گروه HFD+EX میزان بیان BAX نسبت به گروه ND 3/85 بود که تفاوت معنی‌داری با گروه HFD نداشت ($p > 0/05$). نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد اندازه اثر و توان آزمون در مقادیر بدست آمده از بیان ژن *bax* بالا بود این مقادیر به ترتیب 1/16 و 0/915 بالا بودند.



نمودار 1. تغییر محتوای چربی کبد رت‌ها ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD+EX: رژیم غذایی پرچرب و تمرین هوازی.



نمودار 2. تغییرات وزن رت‌ها ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD+EX: رژیم غذایی پرچرب+تمرین هوازی. * اختلاف در سطح معناداری $P < 0/05$



نمودار 3. تغییرات ژن *Chop*، *Atf6*، *Perk* و *Bax*. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD+EX: رژیم غذایی پرچرب+تمرین هوازی. * اختلاف در سطح معناداری $P < 0/05$



بحث

بر اساس یافته‌های پژوهش، وزن بدن رت‌ها به‌طور پیوسته در طول دوازده هفته در تمامی گروه‌ها افزایش یافت. باین‌حال، دوازده هفته رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش بیشتر وزن بدن نسبت به رژیم غذایی نرمال شد. داده‌های حاصل از پژوهش حاضر بیانگر آن است که دوازده هفته رژیم غذایی پرچرب سبب افزایش 10/6 برابر قطرات چربی ذخیره‌شده در کبد گردید. 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 می‌دهد (9).

در بخش دیگر نتایج مطالعه حاضر نشان داد رژیم غذایی پرچرب در طول 12 هفته سبب افزایش ژن‌های *Atf6*, *Chop* و *Perk* شد که در فرایند استرس ER نقش دارند. همچنین نشان داده شد که افزایش بیان این ژن‌ها با افزایش بیان ژن پرو آپوپتوزی *Bax* همراه بود. سلول‌های کبدی از نظر ساختاری غنی از ER هستند، با غشای ER که 50 درصد از کل غشای سلولی را تشکیل می‌دهد (34). استرس ER به‌عنوان یک عامل مهم در پاتوژنز بیماری کبد چرب غیرالکلی شناسایی شده است (12). پاسخ استرس ER برای تنظیم سنتز پروتئین و بازگرداندن تعادل هموستاتیک زمانی که سلول به دلیل تجمع پروتئین‌های ناشده یا تاشده اشتباه تحت فشار قرار می‌گیرد فعال می‌شود. باین‌حال، پاسخ‌های تأخیری یا ناکافی به استرس ER ممکن است مکانیسم‌های فیزیولوژیکی را به پیامدهای پاتولوژیک، از جمله تجمع چربی، مقاومت به انسولین، التهاب و آپوپتوز تبدیل کند (12). اگر استرس ER طولانی و شدید باشد، با فعال کردن مولکول‌های آپوپتوز پایین‌دست، مرگ سلولی را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد به دلیل محتوای بالای ER در کبد که عملکردهای متابولیکی قابل توجهی را اعمال می‌کند، استرس ER و UPR می‌تواند دچار اختلال شود (12).

نتایج مطالعه حاضر بالا رفتن بیان ژن پرو آپوپتوتیک BAX به واسطه رژیم غذایی پرچرب را نشان می‌دهد. وقوع آپوپتوز هپاتوسیت عمدتاً توسط مسیرهای انتقال سیگنال گیرنده مرگ، مسیرهای سیگنال میتوکندری و مسیر ER تنظیم می‌شود (31). در فرآیند آپوپتوز مشتق شده از میتوکندری، FFA اضافی و استرس اکسیداتیو ناشی از تجمع بیش‌ازحد چربی می‌تواند سنتز Bax را افزایش دهد. در نتیجه باعث باز شدن منافذ نفوذ میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C می‌شود. از سوی دیگر، Bcl-2 باز شدن منافذ میتوکندری را سرکوب می‌کند و نسبت کمپلکس پروتئین Bcl-2/Bax مستقیماً با وقوع آپوپتوز مرتبط است (44). سایر مطالعات نیز نشان می‌دهند که رژیم غذایی پرچرب می‌تواند آپوپتوز سلول‌های کبدی را تشدید کند (5, 51). استرس اکسیداتیو، التهاب و سمیت ناشی از تجمع چربی در کبد از مکانیسم‌های احتمالی است که رژیم‌های غذایی پرچرب از طریق آن منجر به فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی آپوپتوز می‌شوند (3). پژوهش‌های دیگر نیز نشان دادند که استرس اکسیداتیو ناشی از رژیم‌های غذایی پرچرب می‌تواند سبب استرس ER و آپوپتوز شود. در واقع، با استرس ER، PERK فعال شده منجر به فسفوریلاسیون $eIF2\alpha$ می‌شود که تضعیف کلی ترجمه را به همراه دارد. این شرایط امکان ترجمه ترجیحی ژن‌های وابسته به UPR مانند ATF4 و CHOP را فراهم می‌کند (35). همسو با داده‌های مطالعه حاضر تاناکا¹ و همکاران گزارش کردند که مسیر IRE1/JNK و مسیر PERK/ATF4/CHOP نیز به‌طور هم‌زمان در ارتباط با آپوپتوز در کبد موش‌هایی که با 16 هفته رژیم غذایی پرچرب تغذیه شده بودند، تنظیم مثبت شدند (49). مکانیسم دقیق تأثیر رژیم پرچرب بر آپوپتوز کبد ممکن است بسته به مطالعات متفاوت باشد، اما به‌طور کلی توافق بر این است که رژیم غذایی پرچرب می‌تواند سبب آسیب کبدی و افزایش آپوپتوز شود. به‌رحال، آپوپتوز با آسیب شدید سلول‌های کبدی و استئاتوهپاتیت همراه است (15).

¹ Tanaka



تجمع چربی کبدی ناشی از رژیم غذایی پرچرب عمدتاً به دلیل افزایش جریان اسیدهای چرب به درون کبد است. مطالعه حسینی و همکاران نشان داد رژیم غذایی پرچرب از طریق افزایش بیان ژن‌های *Srebp* و *Chrebp* احتمالاً سبب افزایش جریان لیپوژنری در سلول‌های کبدی می‌گردد (55). به دلیل افزایش سطح FFA ناشی از رژیم غذایی پرچرب سلول‌های کبدی در متابولیسم دچار اختلال می‌شوند، FFA اشباع‌شده با زنجیره بلند، با تبدیل شدن به TG، افزایش خطر مسیر آپوپتوز میتوکندری هپاتوسیت را به همراه دارد. افزایش آسیب سلول‌های کبدی عمدتاً از استرس اکسیداتیو ناشی از FFA اندامک‌های داخل سلولی، به‌ویژه میتوکندری‌ها و ER ناشی می‌شود (50). از طرف دیگر افزایش لیپوژنر پایدار در سلول‌های کبدی با افزایش سطح چربی درون سیتوپلاسم همراه است. با افزایش سطوح کلسترول و FFA ورود این مواد متابولیتی به داخل سلول افزایش می‌یابد. باین حال شیب غلظت چربی‌ها در ER نسبت به سیتوزول باید پایین نگه‌داشته شود (19). برای این منظور سلول‌ها چربی‌های اضافی را در LDs که از انتهای ER مشتق شده و انبار ذخیره مطمئنی برای ذخیره‌سازی چربی خنثی هستند که می‌توانند از بروز لیپوتوکسیتیسی جلوگیری نمایند (40). همسو با نتایج مطالعه حاضر مطالعات مختلفی نشان دادند که مقادیر بیش‌از‌حد اسیدهای چرب اشباع و کلسترول می‌تواند استرس ER را به دنبال داشته باشد و متابولیسم لیپید را در سلول‌های کبدی، ماکروفاژها و سلول‌های چربی مختل کند (52). نکته جالب اینکه مطالعات اخیر نشان می‌دهد القا استرس ER به‌واسطه داروهای شیمیایی، تشکیل قطرات چربی و لیپوژنر را در سلول‌های کبدی با تنظیم زیرمجموعه‌ای از ژن‌های فعال‌کننده و آنزیم‌های کلیدی لیپوژنیک، افزایش می‌دهند (30). نشان داده‌شده اختلال هموستاز ER در سلول‌های کبدی استئاتوز، التهاب و مقاومت به انسولین را در کبد به دنبال دارد (24).

در خصوص اثرگذاری فعالیت ورزشی بر متابولیسم کبد نتایج مطالعه حاضر نشان داد اجرای فعالیت ورزشی در کاهش محتوای چربی کبد شیوه‌ای کارآمد محسوب می‌شود. به‌گونه‌ای که محتوای چربی کبد در گروه HFD+EX تنها 3/84 برابر بالاتر از گروه ND بود. این مقدار در مقایسه با گروه HFD 2/77 برابر کمتر بود. همچنین تمرین تا حدودی مانع از افزایش بیان ژن‌های درگیر در فرایند استرس ER شد. احتمالاً تمایل به کاهش در بیان ژن پروآپوپتیک *Bax* در گروه HFD+EX به دلیل کاهش در استرس ER به‌واسطه تمرین هوازی بوده است. شواهد نیاز به انجام فعالیت بدنی برای کاهش وزن بدن (در بهترین حالت بیش از 10٪) به‌منظور بهبود متابولیسم کبد و کاهش فیروز را نشان می‌دهد (42) کاهش وزن حاصل از فعالیت بدنی باعث بهبود حساسیت کبدی و محیطی به انسولین می‌شود، اما فعالیت بدنی، صرف‌نظر از تأثیرات روی توده بدن، مستقیماً نشانگرهای استرس اکسیداتیو و التهابی را کاهش داده و آنزیم‌های کبدی را بهبود می‌بخشد. با توجه به داده‌های یک مطالعه مروری اجرای فعالیت ورزشی منظم منجر به کاهش نسبی 20 تا 30 درصدی استئاتوز کبدی، مستقل از کاهش وزن می‌شود (17).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمرین هوازی در رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب می‌تواند تا حدودی از بالا رفتن بیان ژن‌های مرتبط با UPR ناشی از دریافت چربی اضافه جلوگیری نماید. با توجه به متون مقالات به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی می‌تواند اثرات مثبت و منفی بر استرس ER داشته باشد به‌گونه‌ای که یک مطالعه نشان داد فعالیت ورزشی حاد بدنی سبب افزایش استرس ER شده و مسیرهای پاسخ پروتئین باز شده (UPR) را فعال کند، اگرچه مطالعات کمی در خصوص اثرات فعالیت ورزشی بر بیان ژن‌های استرس ER در کبد وجود دارد اما مطالعات اثر فعالیت ورزشی بر بافت‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند نتایج این مطالعات نشان می‌دهد ورزش منظم با شدت متوسط می‌تواند پاسخ‌های ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با استرس ER را کاهش دهد (36). همسو با نتایج مطالعه حاضر چنگ¹ و همکاران نشان دادند که p-

¹ Cheng



PERK، p-EIF2 و CHOP را در عضلات موش‌های تحت رژیم غذایی پرچرب در مقایسه با موش‌های تحت رژیم غذایی نرمال افزایش داشت، این افزایش با تمرینات ورزشی مهار شد (7). به نظر می‌رسد هنگامی که شدت و حجم تمرین بدون دوره‌های استراحت کافی افزایش می‌یابد که در بیش تمرینی مشاهده می‌شود، سازگاری‌ها مثبت رخ نمی‌دهد (36). تمرینات هوازی مزمن الگوهای متنوعی را در بیان نشانگرهای استرس ER نشان می‌دهند. نشان داده شده که فعالیت ورزش روی نوار گردان می‌تواند با کاهش بیان نشانگرهای استرس ER عملکرد قلب را بهبود و سکت قلبی را کاهش دهد (20). در یک پژوهش دیگر نشان داده شده هشت هفته تمرین شنا استرس ER را در موش‌های مسن مهار می‌کند (4). یکی دیگر از پژوهش‌ها نشان داد تمرین ورزشی منظم به مدت 16 هفته، اختلال عملکرد اندوتلیال ناشی از استرس ER را از طریق کاهش نشانگرهای استرس ER موش‌های دیابتی بهبود می‌بخشد (21).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد فعالیت ورزشی احتمالاً از طریق جلوگیری از بیان بیش از حد ژن *Bax* ناشی از رژیم غذایی پرچرب می‌تواند از آپوپتوز جلوگیری نماید. به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر احتمالاً افزایش محتوای چربی کبد به دلیل فعال شدن UPR و آپوپتوز سلول‌های کبدی رخ می‌دهد. براساس فرضیه دوزیه‌ای که مکانیسم NAFLD را توضیح می‌دهد مقاومت به انسولین، دیس لیپیدی، افزایش وزن و چاقی به عنوان ضربه اول در توسعه NAFLD نقش دارند. ضربه دوم به دلیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، آپوپتوز سلول‌های کبدی و فیروز رخ می‌دهد (18). بر اساس نتایج پژوهش‌ها، ارتباط میان فعالیت ورزشی و بیان *Bax* در سلول‌های کبدی رت‌ها پیچیده است و به عوامل مختلفی بستگی دارد. یک مطالعه نشان داد که تمرین تناوبی با شدت بالا بیان ژن *Bax* را در سلول‌های کبدی موش ماده مسن افزایش می‌دهد، درحالی‌که مطالعات دیگر نشان دادند 8 هفته تمرین هوازی در رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب سبب کاهش بیان *Bax* در سلول‌های کبدی گردید (41). وقوع آپوپتوز هپاتوسیت عمدتاً توسط مسیرهای انتقال سیگنال گیرنده مرگ، مسیرهای سیگنال میتوکندریایی و مسیر ER تنظیم می‌شود؛ بنابراین به نظر می‌رسد اجرای فعالیت ورزشی از طریق کاهش استرس ER و یا افزایش ظرفیت ER در تا زدن پروتئین‌ها می‌تواند تا حدودی از افزایش بیان *Bax* و احتمالاً القای آپوپتوز جلوگیری نماید. سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد اگرچه استرس ER در موش‌های چاق و یا دیابتی افزایش یافت اما اتوفازی در موش‌های چاق تحت رژیم غذایی پرچرب مهار می‌شود، به این ترتیب که سطح اتوفازی کبد این موش‌ها کاهش می‌یابد (54). این موضوع نشان می‌دهد که مکانیسم محافظتی اتوفازی که توسط تجمع بیش از حد لیپیدها مسدود شده است، احتمالاً گزینه درمانی برای تسکین استرس ER و اختلال متابولیک است؛ بنابراین، بررسی بیشتر در مورد مکانیسمی که توسط آن اتوفازی مهار می‌شود و تیمارهای بالقوه برای حذف این مهار ضروری است. در حمایت از این فرضیه مطالعه قبلی ما نشان داد اجرای فعالیت ورزشی هوازی توانست از کاهش جریان اتوفازی سلول‌های کبد رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب جلوگیری نماید (55). فعال‌سازی PERK در ابتدا برای بقا حتی در طول استرس خفیف، محافظ و حیاتی است. با این حال، فعال‌سازی *Perk* همچنین منجر به القای *Chop* می‌شود، همان‌طور که در ادامه توضیح داده خواهد شد، عنصر مهمی در تغییر سیگنال‌های بقا به سمت سیگنال‌های مرگ است (48). *P58ipk* به *Perk* متصل و آن را مهار می‌کند، در نتیجه یک حلقه بازخورد منفی ایجاد می‌کند که بلوک ترجمه با واسطه *Perk* را کاهش می‌دهد (53). تنظیم افزایشی P58IPK یک رویداد فوری نیست، زیرا القای آن چند ساعت پس از فسفوریلاسیون PERK و $eIF2\alpha$ رخ می‌دهد. این امکان وجود دارد که رفع بلوک ترجمه به واسطه P58IPK، نشان‌دهنده خاتمه UPR باشد (53). در این مرحله، اگر UPR موفقیت‌آمیز باشد، ER به عملکرد طبیعی بازمی‌گردد و سلول زنده می‌ماند. با این حال، اگر استرس ادامه یابد، از بین بردن بلوک ترجمه توسط P58IPK ممکن است امکان سنتز پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک را فراهم کند (29). اگرچه در این مطالعه ما شاهد افزایش پاسخ UPR به واسطه رژیم غذایی پرچرب و تمایل به کاهش آن



در نتیجه اجرای فعالیت ورزشی بودیم اما شناخت مکانیسم‌های دقیق مولکولی آن نیاز به بررسی بیشتری دارد. همچنین اینکه آیا افزایش بیان Bax از مسیر میتوکندریایی و یا مسیر ER نشات می‌گیرد مشخص نیست.

نتیجه‌گیری کلی و پیام مقاله

در این مطالعه، افزایش محتوای چربی کبد بواسطه HFD در رت‌ها با افزایش بیان نشانگرهای استرس ER همراه بود. افزایش بیان پروآپوپتوز BAX نیز همسو با پاسخ UPR افزایش یافت. در مقابل تمرین هوازی در طول 12 هفته توانست مانع از افزایش استرس ER از طریق کاهش نسبی ژن‌های درگیر در فرایند استرس ER گردد.

محدودیت‌ها

عدم بررسی دقیق مکانیسم‌های مولکولی تمایز بین مسیرهای میتوکندریایی و شبکه آندوپلاسمی در القای آپوپتوز و همچنین عدم شناخت کافی از تأثیر شدت و حجم‌های مختلف تمرین بر پاسخ‌های استرس شبکه آندوپلاسمی، از مهمترین محدودیت‌های پژوهش حاضر محسوب می‌شود.

پیشنهاد برای مطالعات آتی

پیشنهاد می‌شود که اثر شدت‌های مختلف تمرین هوازی و مراحل روند تغییرات بیان ژن‌های کلیدی مسیر استرس شبکه آندوپلاسمی و آپوپتوز کبدی به منظور تعیین دوز بهینه تمرین برای حداکثر اثر محافظتی در برابر کبد چرب ناشی از رژیم غذایی پرچرب بررسی شود.

ملاحظات اخلاقی

رعایت دستورالعمل‌های اخلاقی

این پژوهش با رعایت کامل اصول اخلاقی ناظر بر پژوهش‌های حیوانی و مطابق با دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه با کد IR.SSRI.REC.1401.1519 انجام شده است.

منابع مالی

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی مستقیم از سوی سازمان‌ها یا نهادهای دولتی، خصوصی یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان به طور مشترک در ایده‌پردازی، گردآوری داده‌ها، تحلیل یافته‌ها و نگارش نسخه‌های اولیه و نهایی مقاله همکاری داشته‌اند.

تعارض منافع

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

تقدیر و تشکر

این مقاله از رساله دکتری تخصصی دانشگاه گیلان مستخرج شده است. بدین وسیله از زحمات تمامی کسانی که در این پژوهش همکاری داشتند، تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, et al. (2017). Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med*.377(1):13-27.
2. Ahmadi A, Sheikholeslami-Vatani D, Ghaeni S, Baazm M. (2021). 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*.48:2153-61.

3. Alkhoury N, Carter-Kent C, Feldstein AE. (2011). Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*.5(2):201-12.
4. Chang P, Zhang X, Zhang M, Li G, Hu L, Zhao H, et al. (2020). Swimming exercise inhibits myocardial er stress in the hearts of aged mice by enhancing cgmp-pkg signaling. *Molecular medicine reports*.21(2):549-56.
5. Chen S, Che S, Li S, Wan J, Ruan Z. (2022). High-fat diet exacerbated decabromodiphenyl ether-induced hepatocyte apoptosis via intensifying the transfer of ca(2+) from endoplasmic reticulum to mitochondria. *Environ Pollut*.292(Pt A):118297.
6. Cheng F, Dun Y, Cheng J, Ripley-Gonzalez JW, Jiang W, You B, Liu S. (2022). Exercise activates autophagy and regulates endoplasmic reticulum stress in muscle of high-fat diet mice to alleviate insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*.601:45-51.
7. Cheng F, Dun Y, Cheng J, Ripley-Gonzalez JW, Jiang W, You B, Liu S. (2022). Exercise activates autophagy and regulates endoplasmic reticulum stress in muscle of high-fat diet mice to alleviate insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.601:45-51.
8. Çolak R, Ağaşcıoğlu E, Çakatay U. (2021). "Live high train low" hypoxic training enhances exercise performance with efficient redox homeostasis in rats' soleus muscle. *High Alt Med Biol*.22(1):77-86.
9. Das K, Das K, Mukherjee PS, Ghosh A, Ghosh S, Mridha AR, et al. (2010). Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. *Hepatology*.51(5):1593-602.
10. DeZwaan-McCabe D, Sheldon RD, Gorecki MC, Guo DF, Gansemer ER, Kaufman RJ, et al. (2017). Er stress inhibits liver fatty acid oxidation while unmitigated stress leads to anorexia-induced lipolysis and both liver and kidney steatosis. *Cell Rep*.19(9):1794-806.
11. Festing MF. (2018). On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Laboratory animals*.52(4):341-50.
12. Flessa CM, Kyrou I, Nasiri-Ansari N, Kaltsas G, Papavassiliou AG, Kassi E, Randeve HS. (2021). Endoplasmic reticulum stress and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (nafld): Current evidence and perspectives. *Curr Obes Rep*.10(2):134-61.
13. Gamelin FX, Aucouturier J, Iannotti FA, Piscitelli F, Mazzarella E, Aveta T, et al. (2016). Effects of chronic exercise on the endocannabinoid system in wistar rats with high-fat diet-induced obesity. *J Physiol Biochem*.72(2):183-99.
14. Gharehbagh SA, Azar JT, Razi M. (2021). Ros and metabolomics-mediated autophagy in rat's testicular tissue alter after exercise training; evidence for exercise intensity and outcomes. *Life Sciences*.277:119585.
15. Guicciardi ME, Gores GJ. (2005). Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*.54(7):1024-33.
16. Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. (2017). Prevalence of obesity among adults and youth: United states, 2015-2016. *NCHS Data Brief*. (288):1-8.
17. Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, et al. (2017). Aerobic vs. Resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *Journal of hepatology*.66(1):142-52.
18. Henkel J, Frede K, Schanze N, Vogel H, Schürmann A, Spruss A, et al. (2012). Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by pge2-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and vldl-synthesis. *Laboratory investigation*.92(11):1597-606.
19. Henne M. (2019). And three's a party: Lysosomes, lipid droplets, and the er in lipid trafficking and cell homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*.59:40-9.
20. Hong J, Kim K, Kim J-H, Park Y. (2017). The role of endoplasmic reticulum stress in cardiovascular disease and exercise. *International journal of vascular medicine*.2017.
21. Hong J, Park E, Lee J, Lee Y, Rooney BV, Park Y. (2021). Exercise training mitigates er stress and ucp2 deficiency-associated coronary vascular dysfunction in atherosclerosis. *Scientific reports*.11(1):15449.
22. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*.356(3):213-5.

23. Hotamisligil GS. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*.140(6):900-17.
24. Hotamisligil GS. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*.140(6):900-17.
25. Hotamisligil GS. (2008). Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)*.32 Suppl 7(Suppl 7):S52-4.
26. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. (2018). The c/ebp homologous protein (chop) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol*.9:3083.
27. Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, et al. (2007). Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology Res*.37(1):50-7.
28. Kim Y, Park M, Boghossian S, York DA. (2010). Three weeks voluntary running wheel exercise increases endoplasmic reticulum stress in the brain of mice. *Brain Res*.1317:13-23.
29. Ladiges WC, Knoblaugh SE, Morton JF, Korth MJ, Sopher BL, Baskin CR, et al. (2005). Pancreatic β -cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene p58ipk. *Diabetes*.54(4):1074-81.
30. Lee J-S, Zheng Z, Mendez R, Ha S-W, Xie Y, Zhang K. (2012). Pharmacologic er stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicology letters*.211(1):29-38.
31. Li CP, Li JH, He SY, Li P, Zhong XL. (2014). Roles of fas/fasL, bcl-2/bax, and caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Genet Mol Res*.13(2):3991-9.
32. Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, Dong X, Wei J, Qiu C, Xue JH. (2013). Protein kinase rna-like endoplasmic reticulum kinase (perk) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ros)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol*.12:158.
33. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*.25(4):402-8.
34. Loud AV. (1968). A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol*.37(1):27-46.
35. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. (2006). Free fatty acids induce jnk-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*.281(17):12093-101.
36. Marafon BB, Pinto AP, Ropelle ER, de Moura LP, Cintra DE, Pauli JR, da Silva AS. (2022). Muscle endoplasmic reticulum stress in exercise. *Acta Physiologica*.235(1):e13799.
37. Moncan M, Mnich K, Blomme A, Almanza A, Samali A, Gorman AM. (2021). Regulation of lipid metabolism by the unfolded protein response. *J Cell Mol Med*.25(3):1359-70.
38. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*.306(5695):457-61.
39. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. (2006). Chemical chaperones reduce er stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*.313(5790):1137-40.
40. Qiu S, Xu H, Lin Z, Liu F, Tan F. (2019). The blockade of lipophagy pathway is necessary for docosahexaenoic acid to regulate lipid droplet turnover in hepatic stellate cells. *Biomed Pharmacother*.109:1841-50.
41. Rocha-Rodrigues S, Gonçalves IO, Beleza J, Ascensão A, Magalhães J. (2018). Effects of endurance training on autophagy and apoptotic signaling in visceral adipose tissue of prolonged high fat diet-fed rats. *European journal of nutrition*.57:2237-47.
42. Rodriguez B, Torres DM, Harrison SA. (2012). Physical activity: An essential component of lifestyle modification in nafld. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.9(12):726-31.
43. Ruan L, Li F, Li S, Zhang M, Wang F, Lv X, Liu Q. (2021). Effect of different exercise intensities on hepatocyte apoptosis in hfd-induced nafld in rats: The possible role of endoplasmic reticulum stress through the regulation of the ire1/jnk and eif2 α /chop signal pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.2021.
44. Ruan L, Li F, Li S, Zhang M, Wang F, Lv X, Liu Q. (2021). Effect of different exercise intensities on hepatocyte apoptosis in hfd-induced nafld in rats: The possible role of endoplasmic

reticulum stress through the regulation of the ire1/jnk and eif2 α /chop signal pathways. *Oxid Med Cell Longev.*2021:6378568.

45. Safdar A, Saleem A, Tarnopolsky MA. (2016). The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nat Rev Endocrinol.*12(9):504-17.

46. Santos-Alves E, Marques-Aleixo I, Rizo-Roca D, Torrella J, Oliveira P, Magalhães J, Ascensão A. (2015). Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. *Life sciences.*135:124-30.

47. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. (2017). Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under er stress. *J Cell Physiol.*232(11):2977-84.

48. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports.*7(9):880-5.

49. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, et al. (2016). Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology.*64(6):1994-2014.

50. Wang K. (2014). Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death & Disease.*5(1):e996-e.

51. Wang Y, Ausman LM, Russell RM, Greenberg AS, Wang XD. (2008). Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-jun nh2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic bax. *J Nutr.*138(10):1866-71.

52. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. (2006). Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.*291(2):E275-E81.

53. Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG. (2002). Control of perk eif2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone p58ipk. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*99(25):15920-5.

54. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. (2010). Defective hepatic autophagy in obesity promotes er stress and causes insulin resistance. *Cell metabolism.*11(6):467-78.

55. حسینی م، محبی ح، غفوری ح، رضا دوست مح. (2023). اثر تمرین هوازی در شرایط هیپوکسی و نرم اکسی بر مسیر پیام‌رسانی -لیپوزنز و لیپولیز کبد رت های نر دارای رژیم غذایی پرچرب. مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش