

The effect of interval training and omega-3 on endoplasmic reticulum stress in the liver tissue of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats

Mostafa Kazemi¹, Ahmad Abdi², Alireza Barari², Javad Mehrabani³

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

²Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

³Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Background: Endoplasmic reticulum stress (ERS) plays an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In this study, the effect of omega-3 consumption and interval exercise alone or in combination on ERS in rats with NAFLD was investigated.

Materials and methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats (mean weight 156.98±7.82) were divided into 5 groups: Control-Normal (CN), NAFLD, NAFLD-Training (TRNAF), NAFLD-Supplement (SUPNAF) and NAFLD-Training-Supplement (TRSUPNAF). The supplement groups received 1 g of Omega3 (per kg of body weight) orally during the intervention period. Interval training program including running on treadmill with a speed of 14-28 meters per minute, was performed 5 days a week for eight weeks.

Results: Induction of NAFLD increased GRP78, CHOP, ALT and AST (p=0.0001). The expression of GRP78 and CHOP was significantly decreased in TRNAF (p=0.0001 and p=0.001 respectively) and SUPNAF (p=0.0001 and p=0.001 respectively) groups compared to NAFLD. ALT and AST also significantly decreased in TRNAF (p=0.0001 and p=0.0001) and SUPNAF (p=0.0001 and p=0.001 respectively) groups. The combined intervention of interval training with omega-3 supplement was not significant compared to the effect of each intervention alone on GRP78, CHOP, ALT and AST (p<0.05).

Conclusion: Interval training and omega-3 consumption inhibited ER stress in liver tissue through reduction in GRP78 and CHOP expression. However, the simultaneous effect of interval training and omega-3 on ERS needs more research.

Keywords: Exercise, Omega-3, GRP78, CHOP, Nonalcoholic fatty liver disease.

Cited as: Kazemi M, Abdi A, Barari A, Mehrabani J. The Effect of Interval training and Omega-3 on Endoplasmic Reticulum Stress in the liver Tissue of Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) Rats. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(1): 25-36.

Correspondence to: Ahmad Abdi

Tel: +98 43217126 (11)

E-mail: a.abdi@iauumol.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-7734-7518

Received: 15 May 2023; **Accepted:** 2 Sep 2023

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی

دوره ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۲۵ تا ۳۶

اثر تمرین تناوبی و امگا-۳ بر استرس شبکه آندوپلاسمی بافت کبدی موش‌های کبد چرب غیر الکلی

مصطفی کاظمی^۱، احمد عبدی^۲، علیرضا براری^۲، جواد مهربانی^۳^۱ دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران^۲ دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران^۳ دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استرس شبکه آندوپلاسمی (ERS) نقش مهمی در ایجاد بیماری کبدی چرب غیر الکلی (NAFLD) دارد. در این مطالعه اثر مصرف امگا-۳ و فعالیت ورزشی تناوبی به تنهایی و یا در ترکیب با هم بر ERS در موش‌های مبتلا به NAFLD بررسی شد. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (وزن $156/98 \pm 7/82$ گرم) در پنج گروه بیمار کنترل-سالم (CN)، بیمار (NAFLD)، بیمار-تمرین (TRNAF)، بیمار-مکمل (SUPNAF) و بیمار-تمرین-مکمل (TRSUPNAF) قرار گرفتند. گروه‌های مکمل، طی دوره مداخله روزانه ۱ گرم امگا-۳ (به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) را به صورت خوراکی دریافت کردند. برنامه تمرین تناوبی شامل دویدن روی تردمیل با سرعت ۲۸-۱۴ متر در دقیقه، پنج روز هفته به مدت هشت هفته اجرا شد. **یافته‌ها:** القای NAFLD باعث افزایش GRP78، CHOP، ALT و AST شد ($p=0/0001$). بیان GRP78 و CHOP در گروه‌های TRNAF (به ترتیب $p=0/0001$ و $p=0/001$) و SUPNAF (به ترتیب $p=0/0001$ و $p=0/001$) نسبت به NAFLD کاهش معنی‌داری داشت. ALT و AST نیز در گروه‌های TRNAF (به ترتیب $p=0/0001$ و $p=0/0001$) و SUPNAF (به ترتیب $p=0/0001$ و $p=0/001$) کاهش معنی‌داری داشت. مداخله ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل امگا-۳ نسبت به اثر هر مداخله به تنهایی بر GRP78، CHOP، ALT و AST معنی‌داری نداشت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: تمرین تناوبی و مصرف امگا-۳ از طریق کاهش در بیان GRP78 و CHOP باعث مهار استرس ER در بافت کبد شد. با این وجود اثر همزمان تمرین تناوبی و امگا-۳ بر ERS نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد. **واژگان کلیدی:** فعالیت ورزشی، امگا-۳، GRP78، CHOP، کبد چرب غیر الکلی.

مقدمه

سرطان کبد (HCC: Hepatocellular carcinoma)، پیوند کبد و مرگ و میر مرتبط با بیماری‌های کبد است (۱). بر اساس داده‌های اخیر، NAFLD حدود ۲۵ درصد از افراد بالغ و ۸۵ تا ۹۸ درصد از بیماران چاق را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲). اگرچه اثرات NAFLD باعث ایجاد نگرانی در جهان شده است، مکانیسم اساسی که باعث شروع NAFLD می‌شود، مبهم باقی مانده است (۳). مطالعات اخیر نشان داده است که استرس شبکه آندوپلاسمی (ERS: Endoplasmic

در حال حاضر، در سراسر جهان بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease) در حال تبدیل شدن به شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی و عامل اصلی

آدرس نویسنده مسئول: آمل، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، احمد

عبدی (email: a.abdi@iaumol.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-7734-7518

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۶/۱۱

ورزشی تجمع چربی کبدی را در انسان و حیوان کاهش می‌دهد، با این وجود برخی مطالعات نشان می‌دهد ERS ممکن است با فعالیت ورزشی افزایش یا کاهش یابد. در پژوهش دل‌دیسکو و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده شد که تمرین استقامتی تأثیری بر GRP78 ندارد (۱۰). همچنین نشان داده شد که فعالیت ورزشی شنا به اندازه کافی قادر به سرکوب افزایش GRP78 در موش‌های مسن چاق نیست (۱۱). به نظر می‌رسد اسیدهای چرب مختلف تأثیر متفاوتی بر ERS و فرآیند التهابی متعاقب آن دارند. در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است که اسیدهای چرب اشباع (مانند اسید پالمیتیک) می‌توانند ERS و آپوپتوز را القا کنند و منجر به التهاب و یا دژنراسیون شود (۱۲). مطالعه آزمایشگاهی در سلول‌های کبدی موش صحرایی نشان داد که PUFA، مانند اسید آلفا لینولنیک (۱۵۰ تا ۲۵۰ میکرومول در لیتر به مدت ۱۶ ساعت) در برابر آپوپتوز ناشی از ERS از لیپوتوکسیک اسید استئاریک محافظت می‌کند (۱۳) و پیشنهاد شده است که استفاده از آن یک استراتژی مفید برای مقابله با سمیت چربی ناشی از اسید پالمیتیک رژیم غذایی و همچنین اختلالات مرتبط با چاقی و مقاومت به انسولین است. همچنین نشان داده شده است که روغن ماهی ERS و درصد مرگ سلولی آپوپتوتیک را در جزایر پانکراس کاهش می‌دهد و از اختلال عملکرد سلول‌های بتا در موش‌های چاق مبتلا به دیابت نوع ۲ که به مدت ۸ هفته با رژیم غذایی حاوی ۱۰ درصد روغن ماهی تغذیه شده بودند، جلوگیری می‌کند (۱۴). با توجه به نقش فعالیت ورزشی و امگا-۳ در بهبود عوامل موثر بر استرس شبکه آندوپلاسمی، محققین این پژوهش فرض کردند که تأثیر همزمان تمرین تناوبی و مکمل بیشتر از اثر هر کدام به تنهایی است. با توجه به مطالعات محدود و متناقضی که در این زمینه انجام شده این پژوهش در نظر دارد به این سوال پاسخ دهد که تمرین تناوبی همراه با مصرف امگا-۳ چه اثری بر ژن‌های موثر در استرس شبکه آندوپلاسمی در بافت کبدی موش‌های NAFLD دارد؟

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر هشت هفته‌ای (وزن $7/82 \pm 156/98$ گرم) از نژاد ویستار به عنوان نمونه انتخاب و به مرکز پژوهش منتقل شدند. معیار ورود به مطالعه حاضر شامل نر بودن موش‌ها، سلامت کامل موش‌ها و عدم استفاده از هرگونه دارو بود. معیار خروج از مطالعه عدم

reticulum stress نقش مهمی در توسعه NAFLD ایفا می‌کند. ER اندام اصلی سلولی است که وظیفه تا شدن پروتئین، بیوژنز لیپید و هموستاز کلسیم را بر عهده دارد. عوامل استرس‌زا که ظرفیت تاشوی ER را مختل می‌کنند ممکن است منجر به افزایش پروتئین نابالغ معیوب و تحریک ERS شوند (۴). اگرچه ERS ممکن است مجموعه‌ای از پاسخ‌های جبرانی به نام پاسخ پروتئین باز شده (UPR: unfolded protein response) را فعال کند که به بازیابی هموستاز ER و بقای سلولی کمک می‌کند، استرس پایدار ER به عنوان پیامد عوامل پاتولوژیک مضر مانند رسوب چربی، التهاب، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و اتوفازی شناخته شده است. تمام فرآیندهای ذکر شده در بالا قادر به تحریک توسعه NAFLD هستند (۵). پروتئین تنظیم کننده گلوکز ۷۸ (GRP78: Glucose-regulating protein 78) مسئول چندین فرآیند مهم داخل سلولی، از جمله تسهیل انتقال، تکمیل و تجمع پروتئین‌های تازه تولید شده در سلول است و از طرفی از تا خوردگی اشتباه و تجمع پروتئین‌های بد تا خورده در سلول جلوگیری می‌کند (۶). همچنین پروتئین همولوگ C/EBP (CHOP: C/EBP homologous protein) متعلق به خانواده پروتئین‌های اتصال دهنده CCAAT تقویت کننده (C/EBPs: CCAAT/enhancer binding proteins) است و در تنظیم ژن‌هایی که پروتئین‌های دخیل در تکثیر، تمایز و بیان و متابولیسم انرژی را کد می‌کنند، نقش دارد (۱۹). تحقیقات نشان داد که سلول‌های دارای کمبود CHOP به آپوپتوز ناشی از ERS مقاوم هستند (۶). در موش‌هایی با کمبود CHOP نشان داده شد که آپوپتوز ناشی از CHOP با بسیاری از بیماری‌هایی که باعث ERS می‌شوند، مرتبط است. توصیه‌های درمانی برای بیماران مبتلا به NAFLD شامل تغییر در سبک زندگی و رژیم غذایی با تمرکز بر کاهش وزن و فعالیت بدنی است. در مطالعه‌ای نشان داده شده که کاهش وزن حداقل ۷-۵ درصد برای کاهش استئاتوز کبدی لازم است، اما حدود ۱۰-۸ درصد کاهش وزن برای بهبود التهاب و فیبروز در بیماران مبتلا به NASH مورد نیاز است (۷). بر این اساس، فعالیت ورزشی اغلب به عنوان یک استراتژی غیردارویی برای بهبود NAFLD توصیه می‌شود. فعالیت ورزشی منظم در بیماران NAFLD وزن بدن، مقاومت به انسولین و درجه کبد چرب را کاهش می‌دهد (۸). فعالیت ورزشی ممکن است سطح ERS را در چندین اندام تعدیل کرده و منجر به بهبود هموستاز چربی در کبد و حتی کل بدن شود (۹). اگرچه شواهد قانع کننده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت

منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل، موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین و گروه مکمل-تمرین در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰-۸ متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. برنامه تمرین اصلی با اقتباس از پژوهش دانیل و همکاران (۲۰۱۷) (۱۶) بدین صورت انجام شد که در هفته اول ۱۰ ست فعالیت ۱ دقیقه‌ای و ۲ دقیقه استراحت بین ست‌ها بود، که در هفته آخر به ۱۵ ست رسید. سرعت فعالیت با ۱۴ متر در دقیقه در هفته اول شروع شده و هر هفته ۲ متر در دقیقه بر سرعت افزوده شد تا در هفته هشتم به ۲۸ متر در دقیقه رسید.

مصرف امگا-۳

امگا-۳ از شرکت سیگما آلمان خریداری (شماره محصول: F8020) شد. امگا-۳ شامل ۱۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تری‌دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA: Tri-docosaehaenoic acid) و ۱۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ایکوزاپنتانوییک اسید (EPA: Eicosapentaenoic acid) بود. در پژوهش حاضر حیوانات روزانه ۱ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن امگا-۳ دریافت کردند (۱۷).

روش بافت برداری و اندازه‌گیری متغیرها

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، به منظور از بین بردن اثرات حاد تمرین و مکمل) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بی‌هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس

اجرای پروتکل تمرینی و مصرف نکردن مکمل و آسیب حین اجرا تمرین ورزشی بود. حیوانات در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در تمام مدت آب و غذا (به صورت پلت) به اندازه کافی و آزادانه دریافت کردند. موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آملی رعایت و تایید شد (IR.IAU.AMOL.REC.1401.116). پس از انتقال موش‌های صحرایی به آزمایشگاه و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، به طور تصادفی به دو گروه بیمار NAFLD و کنترل-سالم (CN) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی در گروه کنترل به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی استاندارد (شامل ۱۲٪ چربی، ۵۷٪ کربوهیدرات، ۲۸٪ پروتئین، و ۳٪ سایر موارد) قرار گرفتند، در حالی که جهت القاء NAFLD در موش‌ها، حیوانات به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (شامل ۲۲٪ چربی، ۵۰٪ کربوهیدرات، ۲۴٪ پروتئین و ۴٪ سایر موارد) قرار گرفتند (۱۵). موش‌های صحرایی گروه بیمار مجدداً به ۴ زیر گروه تجربی شامل: بیمار (NAFLD)، بیمار-تمرین (TRNAF)، بیمار-مکمل (SUPNAF) و بیمار-تمرین-مکمل (TRSUPNAF) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه تمرین، یک برنامه هشت هفته‌ای (۵ روز هفته) تمرین تناوبی را اجرا کردند، در حالی که دیگر موش‌های صحرایی در هیچ برنامه تمرینی شرکت داده نشدند.

پروتکل تمرین تناوبی

جدول ۲ پروتکل تمرین تناوبی را برای موش‌های صحرایی مبتلا به NAFLD نشان داده است. قبل از شروع تمرین اصلی و به

جدول ۱. ترکیبات سازنده رژیم غذایی پرچرب و رژیم استاندارد

رژیم استاندارد (درصد)	رژیم پرچرب (درصد)
۱۲	۲۲
۵۷	۵۰
۲۸	۲۴
۳	۴
چربی	
کربوهیدرات	
پروتئین	
سایر مواد	

جدول ۲. پروتکل تمرینی تناوبی برای موش‌های صحرایی NAFLD

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
ست (تکرار)	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۳	۱۴	۱۴	۱۵
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۴	۱۶	۱۸	۲۰	۲۲	۲۴	۲۶	۲۸
مدت استراحت (دقیقه)	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲

جدول ۳. الگوی پرایمر

Genes	Forward primers	Reverse primers
GRP78	5'- CTGAGGCGTATTTGGGAAAG-3'	5'- TCATGACATTCAGTCCAGCAA-3'
CHOP	5'- CTTGAGCCTAACACGTCGATT-3'	5'- TGCACCTCCTTCTGGAACACT-3'
β-actin	5'- GTCACCCACACTGT GCCCATCT-3'	5'-ACAGAGTACTTTCGCTCAGGAG-3'

بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (CT: Threshold Cycle) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای نرمال‌سازی بیان زن از فرمول (کنترل) $ct - ct$ (هدف) $ct = ct - \Delta ct$ استفاده گردید. پس از محاسبه تغییرات بیان زن‌ها با Δct برای کمی‌کردن نتیجه حاصل از تغییرات ct نمونه‌ها، این عدد در فرمول $2^{-\Delta ct}$ وارد و نتایج حاصل بین گروه‌ها مقایسه شد.

تحلیل آماری

برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرها، از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. جهت بررسی مقایسه میانگین تغییرات متغیرهای تحقیق از تحلیل واریانس دو راهه و آزمون تعقیبی بنفرونی استفاده شد. سطح معنی داری در همه موارد $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۶ به اجرا درآمد.

یافته‌ها

میانگین وزن گروه‌ها قبل و بعد از القای NAFLD و همچنین انتهای پروتکل در جدول ۴ ارائه شده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر القای NAFLD باعث افزایش معنی‌داری در میزان GPR78 ($p=0.0001$)، CHOP

از جداسازی، وزن‌کشی و شست و شو با سالیین فوراً به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای -80 درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد.

طراحی و آماده‌سازی پرایمر: جدول ۳ الگوی پرایمر را نمایش می‌دهد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

انجام Real time-PCR: ۲۰ میلی‌گرم از بافت با استفاده از اسکالپر خرد و وارد میکروتیوپ شده، سپس با استفاده از محلول تیزاول، RNA کل سلول‌ها استخراج و خالص‌سازی شد. به cDNA سنتز شده و جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده با استفاده از SYBR Green master mix (Thermo Scientific, USA) و آغازگرهای ذکر شده در جدول ۳ تکثیر شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه SYBR Green qPCR Master Mix انجام شد. پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل ۲۰ ثانیه‌ای در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نسبت

جدول ۴. میانگین وزن موش‌های صحرایی (گرم) در گروه‌های مختلف قبل و بعد از القای چاقی و انتهای پروتکل

گروه‌ها	قبل از القای NAFLD	بعد از القای NAFLD	انتهای پروتکل
CN (n=8)	$19/49 \pm 15/88$	$15/711 \pm 22/63$	$13/43 \pm 275/50$
NAFLD (n=8)	$15/87 \pm 15/63$	$15/09 \pm 154/50$	$12/24 \pm 314/87$
TRNAF (n=8)	$18/12 \pm 157/00$	$18/02 \pm 260/38$	$18/37 \pm 283/50$
SUPNAF (n=8)	$17/00 \pm 154/75$	$18/71 \pm 267/50$	$16/86 \pm 298/00$
TRSUPNAF (n=8)	$17/94 \pm 160/63$	$17/32 \pm 251/13$	$12/27 \pm 265/38$

جدول ۵. نتایج آزمون t مستقل در دو گروه CN و NAFLD

متغیر	p-value	t
GPR78	0.0001	-5/44
CHOP	0.0001	-4/91
ALT	0.0001	-12/38
AST	0.0001	-7/01

جدول ۶. نتایج تحلیل واریانس دوره‌ها برای اثرات تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP) بر بیان مقادیر GPR78

منبع	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	p-value	مجذور اتا (اندازه اثر)	توان
TR	7/508	1	7/508	17/502	0.0001	0/385	0/981
SUP	7/373	1	7/373	17/187	0.0001	0/380	0/979
TR×SUP	0/060	1	0/060	0/139	0/712	0/005	0/065
خطا	12/011	28	0/429				

CHOP معنی داری نشد ($p=0/933$, $f^2=0/0001$) (جدول ۸ و ۹).

علاوه بر این، تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو راهه نشان داد که تمرین تناوبی ($p=0/0001$, $f^2=0/397$) و مکمل امگا-۳ ($p=0/0001$, $f^2=0/375$) باعث کاهش معنی دار ALT در موش‌های صحرایی NAFLD شد. با این وجود مداخله ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل امگا-۳ نسبت به اثر هر مداخله به تنهایی بر ALT معنی داری نشد ($p=0/933$, $f^2=0/0001$) (جدول ۱۰ و ۱۱).

علاوه بر این، تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو راهه نشان داد که تمرین تناوبی ($p=0/0001$, $f^2=0/407$) و مکمل امگا-۳ ($p=0/0001$, $f^2=0/348$) باعث کاهش معنی داری AST در موش‌های صحرایی NAFLD شد. با این وجود مداخله ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل امگا-۳ نسبت به اثر هر مداخله به تنهایی بر AST معنی داری نشد ($p=0/985$, $f^2=0/0001$) (جدول ۱۲ و ۱۳).

AST ($p=0/0001$) و ALT ($p=0/0001$) نسبت به گروه CN شد (جدول ۵).

تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو راهه نشان داد که تمرین تناوبی ($p=0/0001$, $f^2=0/981$) و مکمل امگا-۳ ($p=0/0001$, $f^2=0/979$) باعث کاهش معنی داری در بیان GPR78 بافت کبد موش‌های صحرایی NAFLD شد. با این وجود مداخله ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل امگا-۳ نسبت به اثر هر مداخله به تنهایی بر بیان GPR78 معنی داری نشد ($p=0/712$, $f^2=0/065$) (جدول ۶ و ۷).

همچنین تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو راهه نشان داد که تمرین تناوبی ($p=0/0001$, $f^2=0/348$) و مکمل امگا-۳ ($p=0/0001$, $f^2=0/353$) باعث کاهش معنی داری در بیان CHOP بافت کبد موش‌های صحرایی NAFLD شد. با این وجود مداخله ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل امگا-۳ نسبت به اثر هر مداخله به تنهایی بر بیان

جدول ۷. نتایج آزمون بونفرونی برای مقایسات دوگانه بیان GPR78 بافت کبد برای عامل تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP)

گروه های ۱	گروه های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با TR	بدون TR	-۰/۹۶۹	۰/۲۳۲	۰/۰۰۰۱
با SUP	بدون SUP	-۰/۹۶۰	۰/۲۳۲	۰/۰۰۰۱

جدول ۸. نتایج تحلیل واریانس دوره‌ها برای اثرات تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP) بر بیان مقادیر CHOP

منبع	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات F	p-value	مجذور اتا (اندازه اثر)	توان
TR	۸/۴۰۵	۱	۱۴/۹۷۴	۰/۰۰۱	۰/۳۴۸	۰/۹۶۲
SUP	۸/۵۹۱	۱	۱۵/۳۰۵	۰/۰۰۱	۰/۳۵۳	۰/۹۶۵
TR×SUP	۰/۰۰۴	۱	۰/۰۰۷	۰/۹۳۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۵۱
خطا	۱۵/۷۱۶	۲۸	۰/۵۶۱			

جدول ۹. نتایج آزمون بونفرونی برای مقایسات دوگانه بیان CHOP بافت کبد برای عامل تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP)

گروه های ۱	گروه های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با TR	بدون TR	-۱/۰۲۵	۰/۲۶۵	۰/۰۰۱
با SUP	بدون SUP	-۱/۰۳۶	۰/۲۶۵	۰/۰۰۱

جدول ۱۰. نتایج تحلیل واریانس دوره‌ها برای اثرات تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP) بر مقادیر ALT

منبع	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات F	p-value	مجذور اتا (اندازه اثر)	توان
TR	۳۸۹۴/۰۳۱	۱	۱۸/۴۲۱	۰/۰۰۰۱	۰/۳۹۷	۰/۹۸۵
SUP	۳۵۴۹/۰۳۱	۱	۱۶/۷۸۹	۰/۰۰۰۱	۰/۳۷۵	۰/۹۷۷
TR×SUP	۱/۵۳۱	۱	۰/۰۰۷	۰/۹۳۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۵۱
خطا	۵۹۱۸/۸۷۵	۲۸	۲۱۱/۳۸۸			

جدول ۱۱. نتایج آزمون بونفرونی برای مقایسات دوگانه ALT برای عامل تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP)

گروه های ۱	گروه های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با TR	بدون TR	-۲۲/۰۶۲	۵/۱۴۰	۰/۰۰۰۱
با SUP	بدون SUP	-۲۱/۰۶۲	۵/۱۴۰	۰/۰۰۰۱

جدول ۱۲. نتایج تحلیل واریانس دوره‌ها برای اثرات تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP) بر مقادیر AST

منبع	مجموع مجزورات	درجه آزادی	میانگین مجزورات F	p-value	مجذور اتا (اندازه اثر) توان
TR	۱۷۵۵/۲۸۱	۱	۱۷۵۵/۲۸۱	۰/۰۰۰۱	۰/۴۰۷
SUP	۱۳۶۵/۰۳۱	۱	۱۳۶۵/۰۳۱	۰/۰۰۱	۰/۳۴۸
TR×SUP	۰/۰۳۱	۱	۰/۰۳۱	۰/۹۸۵	۰/۰۰۰۱
خطا	۲۵۵۵/۱۲۵	۲۸	۹۱/۲۵۴		

جدول ۱۳. نتایج آزمون بونفرونی برای مقایسات دوگانه AST برای عامل تمرین تناوبی (TR) و مکمل امگا-۳ (SUP)

گروه های ۱	گروه های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با TR	بدون TR	-۱۴/۸۱۲	۳/۳۷۷	۰/۰۰۰۱
با SUP	بدون SUP	-۱۳/۰۶۲	۳/۳۷	۰/۰۰۱

بحث

همراه بود. همراستا با پژوهش حاضر نشان داده شده که تغذیه موش‌ها با HFD می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار در آنزیم‌های کبدی شود (۱۹). آنزیم‌های کبدی معمولاً به عنوان نشانه‌ای از نارسایی کبد و به عنوان نشانگرهای تشخیصی جایگزین برای NAFLD، جدای از بیوپسی کبد استفاده می‌شوند. هر گونه آسیب به سلول‌های کبدی باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در کبد شده و در نتیجه باعث افزایش سطح آنزیم در سرم می‌شود (۲۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین ورزشی باعث کاهش بیان GRP78 و CHOP باعث کبدی و بهبود در آنزیم‌های کبدی شد. تصور می‌شود پاتوفیزیولوژی NAFLD ناشی از ER باشد (۵). Li و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که HFD باعث NAFLD شده که با اختلال در چربی‌های سرمی و عملکرد کبدی همراه است و باعث افزایش بیان GRP78 و ATF6 می‌شود. با این حال، تمرین تناوبی باعث معکوس شدن این روند شده و ERS کبدی را بهبود می‌بخشد (۲۳). همچنین Tan و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند شش هفته تمرین بدنی باعث کاهش بیان کبدی GRP78 در مدل موش NAFLD می‌شود (۲۴). در پژوهش دیگری که توسط Li و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد، مشاهده شد که فعالیت ورزشی باعث معکوس شدن افزایش بیان CHOP در موش‌های NAFLD ناشی از HFD شد (۲۵). Paes و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که تمرین هوازی روی ترمیم باعث کاهش بیان

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای NAFLD باعث افزایش بیان GRP78 و CHOP باعث کبدی شد. همراستا با پژوهش حاضر Lei و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که به دنبال القای NAFLD با استفاده از HFD، بیان GRP78، CHOP و Activating Transcription Factor 4 (Atf4) کبدی در موش‌ها تنظیم افزایشی داشت (۱۸). همچنین منصور و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که القای NAFLD ناشی از HFD در موش‌های صحرائی با افزایش بیان CHOP و ERS همراه است (۱۹). چاقی با افزایش محتوای کبدی منجر به NAFLD می‌شود. گزارش شده که HFD با افزایش مقاومت به انسولین، NAFLD را القا کرده و با اختلال در اثر انسولین بر کاهش گلوکز باعث افزایش سطوح سرمی TG و TC شده و همچنین وزن بدن و کبد را افزایش می‌دهد. این تغییرات با افزایش آسیب کبدی و استئاتوز کبدی همراه است (۲۰). GRP78 به عنوان یک نشانگرهای اصلی ER و فراوان‌ترین گلیکوپروتئین در ER به عنوان نشانگر زیستی ERS می‌باشد. به نظر می‌رسد ERS می‌تواند منجر به افزایش سنتز TC در سلول‌های کبدی و در نتیجه رسوب چربی و تشدید NAFLD شود. افزایش بیان GRP78 و CHOP به دنبال NAFLD در پژوهش دیگری نیز تأیید شده است (۲۱). در پژوهش حاضر القای NAFLD با افزایش آنزیم‌های کبدی (آلانین ترانس‌آمیناز (ALT) و آسپارات ترانس‌آمیناز (AST))

ورزشی باعث کاهش تجمع چربی ناشی از SREBP-1c در کبد از طریق مسیر AMPK (AMP-activated protein kinase) شده تا mTOR (Mechanistic target of rapamycin) را مهار کرده و باعث بهبود ERS شود (۳۴). در مجموع فعالیت ورزشی با تاثیر بر مسیر سیگنالینگ XBP1 و SREBP های کبدی (sterol regulatory element binding protein)، ERS را تنظیم کرده و در نتیجه با کاهش تجمع چربی در کبد NAFLD را کاهش می‌دهد.

علاوه بر فعالیت ورزشی، رژیم غذایی نیز بر ERS در کبد تأثیر می‌گذارد (۲۸). در سال‌های اخیر، بیشتر پژوهش‌ها روی محصولات طبیعی یا مواد شیمیایی گیاهی با خاصیت تعدیل چربی‌ها، آنتی‌اکسیدان و اثرات ضدالتهابی متمرکز شده است. مطالعه حاضر نشان داد که مصرف امگا-۳ با کاهش بیان GRP78، CHOP و همچنین کاهش آنزیم‌های کبدی همراه بوده و می‌تواند اثر محافظتی در برابر NAFLD داشته باشد. همراستا با پژوهش حاضر Kandeil و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهشی نشان دادند که القای NAFLD باعث افزایش بیان ژن‌های لیپوژنیک (ChREBP: Carbohydrate response element binding protein) و ERS (CHOP، XBP1 و GRP78) شد. با این وجود مصرف زنجبیل و اسید چرب امگا-۳ این تغییرات را به حالت اول برگرداند (۳۵). شواهد موجود نشان می‌دهد که اسید α -لینولنیک (ALA: α -linolenic acid) به عنوان یکی از اجزای اصلی امگا-۳ نیز می‌تواند باعث جلوگیری از استئاتوز کبدی در موش‌های تغذیه شده با HFD شود. Han و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که ALA می‌تواند باعث کاهش نشانگرهای ERS (GRP78 و CHOP) شده و آسیب‌های ناشی از HFD و تجمع اسیدهای چرب را به دنبال NAFLD بهبود بخشد (۳۶). در سلول‌های کبد موش‌های صحرایی مصرف ALA قادر به معکوس کردن سطوح افزایش یافته GRP78 و CHOP است (۳۷). شواهد زیادی نشان می‌دهد که استرس مزمن ER به طور مستقیم یا غیرمستقیم SREBP را تنظیم کرده و باعث افزایش سنتز و ذخیره TG و کلسترول می‌شود که به افزایش استئاتوز کبدی کمک می‌کند (۳۸). به نظر ALA با سرکوب بیان پروتئین SREBP-1c و SREBP-2 باعث کاهش بیوسنتز TG و TC می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً امگا-۳ از طریق مهار فعال‌سازی SREBP ها طی ERS بر متابولیسم چربی‌ها تاثیر داشته و باعث مهار اختلالات ناشی از NAFLD می‌شود. ERS منجر به اختلال چربی، التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز می‌شود که ممکن است یک محیط لیپوتوکسیک را در NAFLD ایجاد

CHOP، GRP78، پروتئین‌های متصل شونده به جعبه X (XBP1: X-box binding protein 1) و کاسپاز-۳ می‌شود (۲۶). معقولی و همکارانش (۱۴۰۱) نشان دادند که تمرین هوازی به مدت هشت هفته عملکرد کبدی را با کاهش در ALT و AST در موش‌های HFD بهبود بخشید (۲۷). با این وجود چند مطالعه نشان داده که تمرین ورزشی تاثیر بر شاخص‌های ERS ندارد (۱۰، ۱۱). طبق گزارشات قبلی بیان GRP78 در کبد تحت تاثیر شدت تمرین ورزشی قرار می‌گیرد (۲۸). بنابراین تنظیم کاهش یا افزایش ERS می‌تواند به نوع، شدت و مدت فعالیت ورزشی مرتبط باشد. نشانگرهای ERS ممکن است پس از فعالیت ورزشی افزایش یا کاهش یابد، اما تاثیر مفید فعالیت ورزشی بر NAFLD تقریباً ثابت است. فعالیت ورزشی با کاهش محتوای چربی کبد تاثیر مثبتی بر NAFLD دارد. فعالیت ورزشی می‌تواند از تجمع پروتئین‌های اشتباه انباشته شده (Accumulated Misfolded Proteins) جلوگیری کرده، آسیب اکسیداتیو، سطوح پروتئین‌های شوک حرارتی و تحمل ورزش را افزایش دهد. استرس متابولیکی ناشی از فعالیت ورزشی می‌تواند پاسخ UPR را فعال کرده و پاسخ سازگاران ناشی از فعالیت ورزشی را واسطه کند. با این وجود پاسخ‌های بیولوژیکی با توجه به شدت و مدت متفاوت بوده و درجات مختلفی از ERS را القا می‌کند (۲۹). علاوه بر این به نظر می‌رسد تجمع نابجای چربی که در مراحل اولیه NAFLD رخ می‌دهد می‌تواند منجر به ERS در کبد شود (۳۰). ERS نیز باعث افزایش بیش از حد چربی و استئاتوز کبدی شده و بنابراین منجر به NAFLD می‌شود. XBP1 نقش مهمی در لیپوژن کبدی دارند. سطح پروتئین لیپوژن را افزایش داد و منجر به تجمع لیپید در کبد می‌شود. فعالیت ورزشی می‌تواند رونویسی XBP1 را در کبد کنترل کند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که ۴ هفته دویدن باعث افزایش XBP1s mRNA کبدی در موش‌های HFD شد (۱۰). نتایج مشابه‌ای در موش‌ها پس از دویدن شش هفته‌ای روی تردومیل نیز مشاهده شد (۳۱). علاوه بر این، تمرین شنا باعث کاهش سطح پروتئین IRE1 α (Inositol-requiring enzyme-1 α) و XBP1 و کاهش محتوای TG کبدی در موش‌های مبتلا به NAFLD می‌شود (۳۲). XBP1 به عنوان یک پروتئین ضد چربی در کبد شناسایی شده است که بیان ژن لیپوژنیک کبدی را کاهش داده و هیپاتوستاتوز را در مدل‌های موش چاق و IR بهبود می‌بخشد (۳۳). به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی با تاثیر بر مسیر سیگنالینگ AMPK/SREBP-1c/mTOR باعث بهبود ERS می‌شود. Li و همکاران نشان دادند که فعالیت

novو تحریک اکسیداسیون اسیدهای چرب، کاتابولیسم لیپیدی را ارتقا می‌دهد. بنابراین، افزایش فعالیت AMPK به عنوان یک رویکرد درمانی برای بهبود NAFLD در نظر گرفته می‌شود. اگرچه چندین مطالعه در مدل‌های موش‌های NAFLD نشان داده‌اند که مکمل‌یاری کوتاه‌مدت یا میان‌مدت امگا-۳ (۴۷) و مداخلات ورزشی (۴۸) می‌توانند فعال‌سازی AMPK را افزایش دهند، اما فقط در یک مطالعه نشان داده شده که ترکیب فعالیت‌بدنی و امگا-۳ باعث افزایش فعال‌سازی AMPK می‌شود (۴۴). از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری AMPK و شاخص‌های التهابی اشاره کرد. با توجه به نقش AMPK و شاخص‌های التهابی در ERS، توصیه می‌شود در پژوهش‌های بعدی این شاخص‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفته تا درک بهتری از مسیرهای موثر تمرین تناوبی و مکمل امگا-۳ بر ERS داشته باشیم. همچنین، مطالعات قبلی نشان داده که جنسیت نقش مهمی در NAFLD دارد. به نظر زنان در معرض خطر NAFLD کمتری نسبت به مردان هستند، اما پس از ایجاد NAFLD، زنان در معرض خطر بیشتری برای فیبروز پیشرفته هستند (۴۹). علاوه بر این، مشخص شد که شیوع NAFLD با افزایش سن در زنان (مستقل از افزایش وزن یا تأثیر سندرم متابولیک) افزایش می‌یابد، اما در مردان چنین نیست. از سوی دیگر، مطالعه‌ای روی موش‌ها نشان داد که موش‌های ماده نسبت به NAFLD حساس‌تر هستند (۵۰). بنابراین توصیه می‌شود در پژوهش‌های بعدی نقش جنسیت در ERS ناشی از NAFLD مورد توجه قرار گیرد.

ER، یک اندامک ضروری برای هموستاز سلولی، نقش اصلی را در مرگ سلولی و سیگنال دهی بقا ایفا می‌کند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای NAFLD ناشی از HFD باعث افزایش در بیان GRP78 و CHOP و همچنین افزایش آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی شد. تمرین تناوبی و مصرف امگا-۳ از طریق کاهش در بیان GRP78 و CHOP باعث مهار ERS می‌شود. با این وجود اثر تعامل تمرین و امگا-۳ بر این شاخص‌ها معنی‌دار نشد و نیاز به پژوهش‌های بیشتر دارد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی انجام شد. بدین وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحدهای دانشگاهی اعلام می‌دارند.

کند (۳۹). استرس مزمن ER از طریق فعال کردن مسیر سیگنال IRE1a منجر به التهاب می‌شود. IRE1a نیز به نوبه خود باعث ترجمه به فاکتور رونویسی XBP1s شده در نتیجه، NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3) فعال شده تا پروکاسپاز-۱ را به شکل فعال خود تبدیل کند که باعث بلوغ و ترشح IL-1 β (Interleukin-1 beta) و IL-18 (Interleukin-18) شده و التهاب متابولیک را القا می‌کند (۴۰). مطالعه بالینی در بیماران NAFLD نشان می‌دهد که بیان پروتئین NLRP3، IL-1 β و IL-18 افزایش می‌یابد. اخیراً نشان داده شده که متابولیت‌های ALA با غیرفعال کردن التهاب NLRP3 اثرات ضد التهابی را القا می‌کنند (۴۱). همچنین، مکمل‌های ALA بر پیشگیری از استئاتوز کبدی که با التهاب و ERS همراه است، مؤثر است (۴۲). با این وجود در مطالعه‌ای نشان داده شد که مصرف روغن ماهی تأثیر معنی‌داری بر سطوح پروتئین GRP78 و CHOP ندارد (۴۳). از دیگر نتایج پژوهش حاضر نبود تفاوت در میزان تغییرات GRP78، CHOP، ALT و AST در مداخله ترکیبی تمرین تناوبی با مکمل امگا-۳ نسبت به اثر هر مداخله به تنهایی بود. هر چند میانگین GRP78، CHOP، ALT و AST در مداخله ترکیبی نسبت به گروه تمرین تناوبی (به ترتیب ۵۲/۴ درصد، ۳۱/۸ درصد، ۲۲/۳ درصد و ۱۹/۶ درصد) و مکمل امگا-۳ (به ترتیب ۳۴/۳ درصد، ۲۷/۳ درصد، ۲۳/۱ درصد و ۱۱/۹ درصد) کاهش داشت. با این وجود، Yang و همکارانش (۲۰۲۱) در پژوهشی نشان دادند که رژیم غذایی غنی‌شده با دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) و تمرین هوازی باعث افزایش ژن‌های Cpt1a (Carnitine palmitoyltransferase I) و PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor) و فعال‌سازی AMPK، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی اکسیداسیون اسیدهای چرب شده و در جلوگیری از تغییرات ناشی از HFD بر روی ژن‌های مرتبط با ERS از قبیل (Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling) ERN1 و XBP1s مؤثر است (۴۴). همچنین نشان داده شد که ترکیب تمرین هوازی همراه با مصرف رژیم‌های غذایی حاوی ALA اثر مضاعفی بر کاهش تجمع چربی کبدی داشته است (۴۵). تأثیر هم‌زمانی تمرین تناوبی و مکمل امگا-۳ در پژوهش‌های قبلی بر شاخص‌های ERS و همچنین آنزیم‌های کبدی احتمالاً با فعال‌سازی AMPK واسطه می‌شود. پژوهش‌های قبلی نیز نشان داده که تغییر در سطوح GRP78 و CHOP تحت تأثیر AMPK قرار می‌گیرد (۴۶). AMPK یک پروتئین حسگر انرژی کلیدی است که با مهار لیپوژنز de

REFERENCES

1. Liu K, McCaughan GW. Epidemiology and etiologic associations of non-alcoholic fatty liver disease and associated HCC. *Adv Exp Med Biol* 2018;1061:3-18.
2. Schwenger KJ, Fischer SE, Jackson TD, Okrainec A, Allard JP. Non-alcoholic fatty liver disease in morbidly obese individuals undergoing bariatric surgery: prevalence and effect of the pre-bariatric very low calorie diet. *Obes Surg* 2018;28:1109-16.
3. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease—a global public health perspective. *J Hepatol* 2019;70:531-44.
4. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, et al. ER stress and disease: toward prevention and treatment. *Biol Pharm Bull* 2017;40:1337-43.
5. Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2018;69:927-47.
6. Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 2017;13:681-96.
7. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015;149:367-78. e5.
8. Marques C, Motta V, Torres T, Aguila M, Mandarim-de-Lacerda C. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:467-75.
9. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015;10:173.
10. Deldicque L, Cani PD, Delzenne NM, Baar K, Francaux M. Endurance training in mice increases the unfolded protein response induced by a high-fat diet. *J Physiol Biochem* 2013;69:215-25.
11. Kristensen CM, Brandt CT, Ringholm S, Pilegaard H. PGC-1 α in aging and lifelong exercise training-mediated regulation of UPR in mouse liver. *Exp Gerontol* 2017;98:124-33.
12. Boslem E, MacIntosh G, Preston AM, Bartley C, Busch AK, Fuller M, et al. A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 β -cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J* 2011;435:267-76.
13. Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L. α -Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 2011;10:1-6.
14. Iizuka Y, Kim H, Izawa T, Sakurai K, Hirako S, Wada M, Matsumoto A. Protective effects of fish oil and pioglitazone on pancreatic tissue in obese KK mice with type 2 diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016;115:53-59. doi: 10.1016/j.plefa.2016.10.007.
15. Efati M, Khorrami M, Zarei Mahmmodabadi A, Raouf Sarshoori J. Induction of an Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using a Formulated High-Fat Diet. *J Babol Uni Med Sci* 2016;18:57-62. [In Persian]
16. Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB, et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav* 2018;184:6-11.
17. de Andrade AM, Fernandes MdC, de Fraga LS, Porawski M, Giovenardi M, Guedes RP. Omega-3 fatty acids revert high-fat diet-induced neuroinflammation but not recognition memory impairment in rats. *Metab Brain Dis* 2017;32:1871-81.
18. Lei ZX, Wang JJ, Li K, Liu P. Herp knockout protects against nonalcoholic fatty liver disease in mice on a high fat diet. *Kaohsiung J Med Sci* 2021;37:487-96.
19. Mansour SZ, Moustafa EM, Moawed FS. Modulation of endoplasmic reticulum stress via sulforaphane-mediated AMPK upregulation against nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Cell Stress Chaperones* 2022;27:499-511.
20. Sathyanarayana AR, Lu C-K, Liaw C-C, Chang C-C, Han H-Y, Green BD, et al. 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl-d-glucose Interrupts the Early Adipocyte Lifecycle and Attenuates Adiposity and Hepatic Steatosis in Mice with Diet-Induced Obesity. *Int J Mol Sci* 2022;23:4052.
21. Gonzalez-Rodriguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos M, Pardo V, Miquilena-Colina M, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis* 2014;5:e1179.

22. Eliades M, Spyrou E, Agrawal N, Lazo M, Brancati F, Potter J, et al. Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:246-54.
23. Li J, Huang L, Xiong W, Gu C, Zhang S, Xue X. Effect of aerobic exercise on GRP78 and ATF6 expressions in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *Sport Med Health Sci* 2022;22. [In Press]
24. Tan N, Li X, Zhai L, Liu D, Li J, Yokota H, et al. Effects of knee loading on obesity-related non-alcoholic fatty liver disease in an ovariectomized mouse model with high-fat diet. *Hepato Res* 2018;48:839-49.
25. Li J, Huang L, Xiong W, Qian Y, Song M. Aerobic exercise improves non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the protein expression of the CNPY2-PERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;603:35-40.
26. Paes L, Lima D, Matsuura C, de Souza MdG, Cyrino F, Barbosa C, et al. Effects of moderate and high intensity isocaloric aerobic training upon microvascular reactivity and myocardial oxidative stress in rats. *PloS One* 2020;15:e0218228.
27. Magholi AA, Abdi A, Abbasi dalooi A. The Effect of Eight Weeks of Aerobic Training and Royal Jelly on Oxidative Stress and Liver Tissue Enzymes in Obese Rats. *J Sport Biosci* 2022;14:29-42. [In Persian]
28. Zou Y, Qi Z. Understanding the role of exercise in nonalcoholic fatty liver disease: ers-linked molecular pathways. *Mediators Inflamm* 2020;2020.
29. Estébanez B, De Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. Endoplasmic reticulum unfolded protein response, aging and exercise: An update. *Front Physiol* 2018;9:1744.
30. Wires ES, Trychta KA, Bäck S, Sulima A, Rice KC, Harvey BK. High fat diet disrupts endoplasmic reticulum calcium homeostasis in the rat liver. *J Hepatol* 2017;67:1009-17.
31. Chapados NA, Lavoie JM. Exercise training increases hepatic endoplasmic reticulum (er) stress protein expression in MTP-inhibited high-fat fed rats. *Cell Biochem Funct* 2010;28:202-10.
32. Okada LSdRR, Oliveira CP, Stefano JT, Nogueira MA, da Silva IDC, Cordeiro FB, et al. Omega-3 PUFA modulate lipogenesis, ER stress, and mitochondrial dysfunction markers in NASH—proteomic and lipidomic insight. *Clin Nutr* 2018;37:1474-84.
33. Herrema H, Zhou Y, Zhang D, Lee J, Hernandez MAS, Shulman GI, et al. XBP1s is an anti-lipogenic protein. *J Biol Chem* 2016;291:17394-404.
34. Li H, Min Q, Ouyang C, Lee J, He C, Zou M-H, et al. AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1844-54.
35. Kandeil MA, Hashem RM, Mahmoud MO, Hetta MH, Tohamy MA. Zingiber officinale extract and omega-3 fatty acids ameliorate endoplasmic reticulum stress in a nonalcoholic fatty liver rat model. *J Food Biochem* 2019;43:e13076.
36. Han H, Guo Y, Li X, Shi D, Xue T, Wang L, et al. Plant sterol ester of α -linolenic acid attenuates nonalcoholic fatty liver disease by rescuing the adaption to endoplasmic reticulum stress and enhancing mitochondrial biogenesis. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019:8294141.
37. Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J. Effect of α -linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 2011;10:1-6.
38. Flister KFT, Pinto BAS, França LM, Coêlho CFF, Dos Santos PC, Vale CC, et al. Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice. *J Nutr Biochem* 2018;62:155-66.
39. Zhang X-Q, Xu C-F, Yu C-H, Chen W-X, Li Y-M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* 2014;20:1768.
40. Lebeaupin C, Proics E, De Bieville C, Rousseau D, Bonnafous S, Patouraux S, et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis* 2015;6:e1879-e.
41. Kumar N, Gupta G, Anilkumar K, Fatima N, Karnati R, Reddy GV, et al. 15-Lipoxygenase metabolites of α -linolenic acid, [13-(S)-HPOTrE and 13-(S)-HOTrE], mediate anti-inflammatory effects by inactivating NLRP3 inflammasome. *Sci Rep* 2016;6:1-14.
42. Gonçalves NB, Bannitz RF, Silva BR, Becari DD, Poloni C, Gomes PM, et al. α -Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Clinics* 2018;73:e150.
43. Kao R-H, Lai G-M, Chow J-M, Liao C-H, Zheng Y-M, Tsai W-L, et al. Opposite regulation of CHOP and GRP78 and synergistic apoptosis induction by selenium Yeast and Fish Oil via AMPK activation in lung adenocarcinoma cells. *Nutrients* 2018;10:1458.

44. Yang J, Sáinz N, Félix-Soriano E, Gil-Iturbe E, Castilla-Madriral R, Fernández-Galilea M, et al. Effects of long-term DHA supplementation and physical exercise on non-alcoholic fatty liver development in obese aged female mice. *Nutrients* 2021;13:501.
45. Miotto PM, Horbatuk M, Proudfoot R, Matravadia S, Bakovic M, Chabowski A, et al. α -Linolenic acid supplementation and exercise training reveal independent and additive responses on hepatic lipid accumulation in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017;312:E461-E70.
46. Leclerc GM, Leclerc GJ, Kuznetsov JN, DeSalvo J, Barredo JC. Metformin induces apoptosis through AMPK-dependent inhibition of UPR signaling in ALL lymphoblasts. *PloS One* 2013;8:e74420.
47. Liu L, Hu Q, Wu H, Wang X, Gao C, Chen G, et al. Dietary DHA/EPA ratio changes fatty acid composition and attenuates diet-induced accumulation of lipid in the liver of ApoE^{-/-} mice. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018.
48. Guarino M, Kumar P, Felser A, Terracciano LM, Guixé-Muntet S, Humar B, et al. Exercise attenuates the transition from fatty liver to steatohepatitis and reduces tumor formation in mice. *Cancers* 2020;12:1407.
49. Balakrishnan M, Patel P, Dunn-Valadez S, Dao C, Khan V, Ali H, et al. Women Have a Lower Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease but a Higher Risk of Progression vs Men: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2021;19:61-71.
50. Spruss A, Henkel J, Kanuri G, Blank D, Püschel GP, Bischoff SC, et al. Female mice are more susceptible to nonalcoholic fatty liver disease: sex-specific regulation of the hepatic AMP-activated protein kinase-plasminogen activator inhibitor 1 cascade, but not the hepatic endotoxin response. *Mol Med* 2012;18:1346-55.