



The effect of regular exercise training on gene expression of Autophagy related protein 5 (ATG5) and Autophagy related protein 7 (ATG7) of white adipose tissue of mice with a high-fat diet

Daneshyar S^{a*}, Khosravi A^b, OmidAli F^c, Shokati Basir S^d

^{a*} Assistant Professor, Department of Physical Education, Faculty of Humanities, University of Ayatollah Arozma Boroujerdi, Lorestan, Iran. s.daneshyar@abru.ac.ir

^b Assistant Professor, Department of Physical Education, Faculty of Humanities, University of Ayatollah Arozma Boroujerdi, Lorestan, Iran. stu_khosravi1@yahoo.com

^c Instructor, Department of Physical Education, Faculty of Humanities, University of Ayatollah Arozma Boroujerdi, Lorestan, Iran. omidali.fatemeh@yahoo.com


^d PhD in exercise physiology, Department of exercise physiology, Faculty of Physical Education, University of Guilan, Guilan, Iran. Shokati2012@gmail.com

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Daneshyar S, Khosravi A, OmidAli Fc, Shokati Basir S. The effect of regular exercise training on gene expression of Autophagy related protein 5 (ATG5) and Autophagy related protein 7 (ATG7) of white adipose tissue of mice with high fat diet. Journal of Cell and Tissue 2022;13(12):95-106.

 <https://10.52547/JCT/13.2.95>

KEYWORDS

Autophagy, Adipose tissue, ATG5, ATG7, Exercise training, High fat diet

ABSTRACT

Aim: Previous studies have shown that Autophagy (lysosome-dependent self-degradation) is upregulated in white adipose tissue of obese subjects. Autophagy-related proteins i.e ATG5 and ATG7 play an essential role in the early stage of the autophagic process. On the other hand, it was found that exercise training modified the bad regulation and maladaptation of white adipose tissue by many molecular mechanisms. Therefore, a question remains to be elucidated whether exercise training can modulate the upregulation of Autophagy induced by a high-fat diet and Autophagy seen in obese subjects. Thus, the present study aimed to survey the effect of regular exercise training on gene expressions of ATG5 and ATG7 in white adipose tissue of mice fed a high-fat diet.

Material and Methods: Twenty-one C57BL/6 male mice (age of four weeks; Approximate body weight of 12 grams) were purchased from the experimental and comparative studies center of Iran University of Medical Sciences. The mice were randomly assigned to three groups: Control (C, n=7), 2) High-fat diet (HFD, n=7), and High-fat diet with exercise training (HFD-ET, n=7). The mice of the HFD group were fed a high-fat diet (42% kcal of fat) for 12 weeks. The mice of the HFD-ET group were submitted to continuous running on a treadmill for six weeks along with feeding HFD. After the experiment, mice were sacrificed, and visceral adipose tissue pads (epididymal fat) were surgically collected. The Real-Time-PCR methods were used to measure the mRNA expression of ATG5 and ATG7. Data of research were statically analyzed by One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test.

* Corresponding author. Tel.: +98- 66- 33204037; Fax: +98-66-33204037

E-mail address: daneshyar@abru.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.2.95>

Received: October 10, 2021; Received in revised form: January 28, 2022; Accepted: March 16, 2022

Original Article

© Author



Results. Data showed that the mRNA expression of ATG5 and ATG7 were higher over two-fold in the HFD group as compared to the control group ($p < 0.05$). Further, the mRNA expression of these genes was higher in the HFD-ET group compared to the control group ($p < 0.01$). Interestingly, the mRNA expression of ATG7 was 1.5 fold higher in the HFD-ET group compared to the HFD group ($p < 0.05$). However, the mRNA expression of ATG5 was not significantly changed in the HFD-ET group as compared to the HFD group ($p > 0.05$).

Conclusion. These results indicate that long-term feeding high-fat diet causes upregulating of the gene expression of key factors involved in the early stage of the autophagy process (i.e ATG5 and ATG7). Regular exercise training could augment the HFD-induced upregulation of ATG7 gene expression. However, it could not change the HFD-induced upregulation of ATG5 gene expression. Based on the results could be speculated that exercise training accompanied by a high-fat diet may more stimulate the autophagy mechanism in white adipose tissue, probably resulting in a positive adaptation in white adipose tissue development.



اثر تمرین منظم ورزشی بر پروتئین‌های مرتبط با آتوفاژی (ATG5) و (ATG7) در بافت چربی سفید موش‌های دارای تغذیه پرچرب

سعید دانش‌یار^{۱*}، امیر خسروی^۲، فاطمه امید علی^۳، سعید شوکتی بصیر^۴

^۱ استادیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت اله العظمی بروجردی (ره)، لرستان، ایران s.daneshyar@abru.ac.ir

^۲ استادیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت اله العظمی بروجردی (ره)، لرستان، ایران stu_khosravi1@yahoo.com

^۳ مربی، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت اله العظمی بروجردی (ره)، لرستان، ایران omidali.fatemeh@yahoo.com

^۴ دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران Shokati2012@yahoo.com

واژگان کلیدی	چکیده
آتوفاژی، بافت چربی، ATG5، ATG7، تمرین ورزشی، تغذیه پرچرب	<p>هدف: مطالعات نشان داده‌اند که آتوفاژی (فرایند خود تجزیه‌ای وابسته به لیزوزوم) در بافت چربی افراد چاق دارای تغذیه پرچرب افزایش تنظیمی می‌یابد. پروتئین‌های مرتبط به آتوفاژی یعنی ATG5 و ATG7 در مراحل اولیه فرایند آتوفاژی نقش کلیدی ایفا می‌کنند. از طرف دیگر نشان داده شده است که تمرینات ورزشی، بدعملکردی یا بدسازگاری بافت چربی، که در افراد چاق بروز می‌یابد، را از طریق سازوکارهای سلولی مختلف اصلاح می‌کنند. از این رو، این سوال مطرح می‌شود که آیا تمرینات ورزشی می‌تواند بیش تنظیمی آتوفاژی، که در بافت چربی افراد چاق و دارای تغذیه پرچرب بروز می‌یابد، را تعدیل نماید. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین منظم ورزشی بر بیان ژن‌های 7GTA و 5GTA در بافت چربی سفید موش‌های دارای تغذیه پرچرب است. مواد و روش‌ها: ۲۱ سر موش سوری نر نژاد C75BL/6 با سن تقریبی چهار هفته و با وزن تقریبی ۲۱ گرم از مرکز مطالعات تجربی و مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری شدند. این موش‌ها به صورت تصادفی در سه گروه؛ کنترل (هفت سر)، تغذیه پرچرب (هفت سر) و تمرین ورزشی-تغذیه پرچرب (هفت سر) جای گرفتند. موش‌های گروه تغذیه پرچرب، به مدت ۱۲ هفته رژیم غذایی پرچرب (۴۲ درصد) دریافت کردند. موش‌های گروه تمرین ورزشی-تغذیه پرچرب، علاوه بر اینکه رژیم غذایی پرچرب دریافت می‌کردند، به مدت شش هفته، تحت تمرین استقامتی تداومی بر روی نوارگردان قرار گرفتند. پس از پایان مداخله پژوهش، موش‌ها بی‌هوش شدند و بافت چربی احشائی منطقه اپی‌دیدیمال برای اندازه‌گیری آزمایشگاهی با جراحی خارج شد. برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌های یعنی 7GTA و 5GTA از روش RCP-emiT laeR استفاده شد. داده‌های پژوهش از طریق آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل آماری شدند. نتایج: داده‌های این پژوهش نشان داد که بیان mRNA ژن‌های ATG5 و ATG7 در بافت چربی گروه تغذیه پرچرب در مقایسه با گروه کنترل بیش از دو برابر بیشتر بود ($p < 0.05$). همچنین بیان mRNA ی این ژن‌ها در گروه تغذیه پرچرب-تمرین ورزشی در قیاس با گروه کنترل بیشتر بود ($p > 0.01$). مهم‌تر این‌که بیان ژن ATG7 در گروه تغذیه پرچرب-تمرین ورزشی در قیاس با گروه تغذیه پرچرب ۱/۵ برابر بیشتر بود ($p > 0.05$). با این حال، بیان ژن ATG5 در گروه تغذیه پرچرب-تمرین ورزشی در قیاس با گروه تغذیه پرچرب تفاوت معنی دار نداشت ($p < 0.05$). نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش دلالت بر این دارد که تغذیه پرچرب در طولانی مدت موجب افزایش بیان ژن‌های عوامل دخیل در مرحله اولیه فرایند آتوفاژی (یعنی ATG5 و ATG7) در بافت چربی سفید می‌شود و تمرین منظم ورزشی، افزایش بیان ژن 7GTA ناشی از تغذیه پرچرب را تقویت می‌کند، اما این تمرین، میزان بیان افزایش یافته 5GTA ناشی از تغذیه پرچرب را تغییر نمی‌دهد. بر این اساس می‌توان استدلال کرد که توأم شدن تمرین ورزشی و تغذیه پرچرب موجب تحریک بیشتر سازوکار آتوفاژی در بافت چربی سفید می‌شود که احتمالاً سازگاری مثبتی در جهت نمو بافت چربی باشد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵	

۱- مقدمه

ماکروآتوفازی (یا به عبارت ساده‌تر اتوفازی) فرایند خود تجزیه‌ای وابسته به لیزوزوم است که در تنظیم متابولیسم و حفظ هموستاز نقش مهمی ایفا می‌کند. اتوفازی قادر است اندامک غیر ضروری و آسیب دیده سیتوزولی و همچنین ماکرومولکول‌های انباشته شده همچون گلیکوژن، لیپید و پروتئین را تجزیه کند (۱، ۲).

مطالعات نشان داده‌اند که اتوفازی از طریق تقویت ادیپوژنسیس (نمو سلول‌های چربی)، نقش اساسی در گسترش بافت چربی و افزایش انبار ذخایر چربی ایفا می‌کند (۳-۵). از سوی دیگر، اختلال در عملکرد اتوفازی می‌تواند با اختلال گسترش بافت چربی، التهاب و دیس لیپیدی همراه شود و که نتیجه آن بروز مقاومت انسولینی و سندرم متابولیک است (۶، ۷). یکی از اختلالاتی که در مراحل اولیه بروز چاقی ظاهر می‌شود، تجمع غیر طبیعی چربی در مخازن بافت چربی است (۸) که با اختلال عملکرد بافت چربی و عوارض متابولیکی مرتبط با چاقی همراه می‌شود (۹). بر این اساس، عملکرد بهینه اتوفازی در گسترش مناسب بافت چربی و جلوگیری از عوارض مرتبط با چاقی نقش دارد (۱۰).

فرایند اتوفازی از چندین مرحله متوالی تشکیل شده است (۱۱، ۱۲): ۱. تشکیل فاگوفر (Phagophore) ۲. تشکیل ساختار دولایه و زیکولی اتوفازوزوم (Autophagosome) ۳. الحاق لیزوزوم به اتوفازوزوم ۴. تجزیه محتوای اتوفازوزوم در مراحل اولیه فرایند اتوفازی، فاگوفرها طویل و گسترش می‌یابند و ماکرومولکول‌های سیتوزولی را به صورت و زیکولی حلقه می‌کنند که اتوفازوزوم نامیده می‌شود. این مرحله مهم از اتوفازی توسط پروتئین‌های متعدد اتوفازی که سیستم کونجاکشن (conjugation) را تشکیل می‌دهند، انجام می‌شود (۱۳). از بین پروتئین‌های مرتبط با اتوفازی (Autophagy related proteins) ATG5 و ATG7 به عنوان عوامل مهم و کلیدی در تشکیل اتوفازوزوم ایفا نقش می‌کنند. به عبارت بهتر، ATG5 در تشکیل فاگوفر و ATG7 در تشکیل اتوفازوزوم درگیر هستند (۱۳).

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که میزان پروتئین ATG5 و ATG7 در بافت چربی افراد چاق، بالاتر از میزان آن در افراد غیر چاق است (۱۴، ۱۵). همچنین، مطالعه‌ای نشان داد که در چاقی ناشی از تغذیه پرچرب، محتوای پروتئینی ATG5-ATG12 در بافت چربی موش افزایش می‌یابد (۱۶). این یافته‌ها دلالت بر این دارند که اتوفازی در بافت چربی افراد چاق افزایش تنظیمی می‌یابد. نقطه مقابل تغذیه غذای پرکالری، نقش تمرینات منظم ورزشی در جلوگیری از چاقی و عوارض مرتبط با چاقی اثبات شده است (۱۷، ۱۸). تمرینات ورزشی از طریق سازوکارهای مختلف می‌تواند بدعملکردی یا بدسازگاری بافت چربی که در افراد چاق بروز می‌یابد را اصلاح کند. برخی از بازسازی‌هایی که در سطح بافت چربی بروز می‌یابد، عبارت است از کاهش عوامل التهاب‌زا، افزایش سطح آنزیم‌های متابولیکی، تغییر ریخت شناسی، تقویت بیوژنز میتوکندری، افزایش بیان ژن‌های مربوط به بافت چربی قهوه‌ای و ظهور بیان برخی از ژن‌های مربوط به عضلات اسکلتی (۱۹، ۲۰).

بر اساس مطالب ذکر شده، این سوال مطرح می‌شود که آیا تمرینات ورزشی می‌توانند این بیش تنظیمی اتوفازی (به‌عنوان یک بدتنظیمی) را در سطح بافت چربی افراد دارای تغذیه پرچرب و چاق اصلاح نماید؟ بر اساس جستجوهای انجام شده، تا کنون اثر تمرین ورزشی بر اتوفازی ناشی از تغذیه پرچرب و یا بیش‌فعالی اتوفازی موجود در آزمودنی‌های چاق مطالعه نشده است. از این رو، مطالعه‌ی اثر تمرینات ورزشی بر بیش تنظیمی اتوفازی در افراد دارای تغذیه پرچرب و چاق اهمیت به‌سزایی دارد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی اثر تمرین منظم ورزشی بر بیان ژن‌های پروتئین‌های کلیدی مرتبط با اتوفازی یعنی ATG5 و ATG7 در بافت چربی سفید موش‌های دارای تغذیه پرچرب بود.

۲- مواد و روش‌ها

نوع تحقیق و آزمودنی‌های تحقیق: این پژوهش از نوع تجربی-توسعه‌ای بروی موش‌ها سوری بود. ۲۱ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با سن تقریبی چهار هفته و با وزن تقریبی ۱۲ گرم از مرکز مطالعات تجربی و مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری شدند. روش نگه‌داری و اعمال مداخله در مورد آزمودنی‌های حیوانی این پژوهش بر اساس دستورالعمل کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی و تاییدیه کمیته اخلاق ذیل معاونت پژوهشی دانشگاه آیت اله بروجردی (شماره:

انجام شد. نمونه‌ها تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۰۴ تا ۰۶ درصد نگهداری می‌شدند. در طول نگهداری حیوانات، آب و غذای استاندارد موش (شرکت خوراک دام به‌پرور کرج) به‌میزان دلخواه در اختیار آن‌ها گذاشته می‌شد. پس از همسان سازی وزن، ۱۲ سر موش به‌صورت تصادفی به سه گروه: ۱. کنترل (هفت سر) و ۲. تغذیه پرچرب (هفت سر) ۳. تغذیه-تمرین (هفت سر) تقسیم شدند. پس از یک هفته آشناسازی با محیط، از سن پنج هفتگی غذای پرچرب در دسترس نمونه‌های گروه تغذیه پرچرب قرار گرفت. گروه تغذیه-تمرین، پس از گذشت شش هفته از مصرف غذای پرچرب در سن ۱۱ هفتگی، به مدت شش هفته تحت تمرین استقامتی تداومی بر روی نوارگردان قرار گرفتند. مصرف غذای پرچرب تا انتهای پروتکل ادامه یافت.

غذای پرچرب: به منظور افزایش وزن موش‌ها، از سن پنج هفتگی تا انتهای پروتکل پژوهش (سن ۱۷ هفته) یعنی ۱۲ هفته، غذای پرچرب در دسترس موش‌ها قرار گرفت. غذای پرچرب شامل ۴۲ درصد چربی (کیلوکالری)، ۴۰ درصد کربوهیدرات (کیلوکالری) و ۱۸ درصد پروتئین (کیلوکالری) بود. به‌دلیل نبود پلت‌های آماده غذای پرچرب، قرص‌های غذایی توسط شرکت دام طیور به‌پرور (کرج) ساخته شد. موش‌های گروه کنترل با غذای استاندارد موش‌ها تغذیه شدند که شامل ۱۵ درصد چربی (کیلوکالری)، ۲۵ درصد پروتئین (کیلوکالری) و ۶۰ درصد کربوهیدرات (کیلوکالری) بود (۲۱، ۲۲).

تمرین ورزشی: تمرین ورزشی تجویز شده در این پژوهش در برگیرنده دوییدن به‌صورت استقامتی تداومی بر روی نوارگردان ویژه موش (شرکت پیشرو اندیشه صنعت-ساخت ایران) با شیب صفر درجه، به‌مدت شش هفته بود. این پروتکل تمرینی بر اساس افزایش تدریجی بارکاری شامل شدت (سرعت) و حجم تمرین (مدت هر جلسه) طراحی شده بود؛ به طوری که موش‌ها در هفته اول با سرعت ۱۴ متر در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه و در هفته ششم با سرعت ۲۰ متر در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه دوییدند (۲۳-۲۵).

جراحی و استخراج بافت: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از یک شب ناشتایی (هشت ساعت)، حیوانات از طریق تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند (۲۲) و چربی احشائی منطقه اپی‌دیدیمال (Epididymal) آن‌ها برداشته شد و در داخل میکروتیوب قرار گرفت. سپس، میکروتیوب‌ها (حاوی نمونه‌های بافتی) به‌سرعت در داخل تانک حاوی نیتروژن مایع، قرار داده شدند تا فریز شوند. نمونه‌های بافتی از طریق آن تانک به آزمایشگاه انتقال داده شدند و در آزمایشگاه، از تانک به‌داخل یخچال فریزر (۰۸- درجه سانتی‌گراد) انتقال یافتند.

سنجش میزان بیان ژن: طراحی و سنتز پرایمر: توالی پرایمر ژن‌های ATG5 و ATG7 و ژن خانه گردان GAPDH به‌عنوان ژن کنترل از مطالعات گذشته اخذ شد (۲۶). سپس ویژگی و کیفیت پرایمر توسط سایت بلست پرایمر (primer-blast/NCBI) و امکان تشکیل ساختارهای دایمر و سنجاک سر توسط نرم افزار اولیگوآنالیزور (Oligo Analyzer - 1.0.2) بررسی و مورد تایید قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناکلون سنتز شد. مشخصات پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده است.

استخراج RNA: RNA بافت چربی طبق دستورالعمل کیت ترایزول (سفر آژما/Thermo Scientific) استخراج شد. به‌طور خلاصه: ۵۰ میلی‌گرم از نمونه بافت چربی، پس از افزودن یک میلی‌لیتر محلول ترایزول، از طریق دستگاه هم‌زن هم‌وژن شد. بافت هم‌وژن شده در دوره‌های متفاوت سانتریفوژ شد که محصول آن تشکیل رسوب حاوی RNA بود که پس از اضافه کردن آب دیس (سفر آژما/Thermo Scientific) به‌مدت ۱۰ دقیقه درون دستگاه ترموبلاک (KiagenTech, Canada) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد.

قرائت غلظت RNA: خلوص (در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر) و غلظت (در طول موج ۲۶۰ نانومتر) RNA استخراج شده توسط دستگاه طیف سنجی نور (Pharmacia Biotech Ultraspec 3000) از طریق فرایند جذب نوری (OD) تعیین شد. خلوص بیشتر از ۱/۶ مورد قبول واقع شد.

سنتز *rdNA* استخراج شده در مرحله قبل، به روش رونویسی معکوس، توسط دستورالعمل کیت سنتز cDNA (سفیر آزما/Thermo Scientific) به DNA مکمل تبدیل شد. در طی این مرحله، مواد ذیل به کار گرفته شد: رندم هگزامر (Random Hexamer)، مهار کننده RNAase، آنزیم رونویس معکوس (Revert Aid)، بافر و بازهای سازندهی DNA (dNTPs) استفاده شد.

واکنش *Real Time RT-PCR* برای انجام مراحل Real Time-RT-PCR از کیت پریمکس سایبر (SYBR@Premix Ex Tag) (TM; TaKaRa, Japan) استفاده شد. واکنش‌ها به صورت دوتایی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط واکنش شامل سه میکرولیتر cDNA (۱۰ درصد)، نیم میکرولیتر پرایمر رفت (غلظت ۱۰ پیکومول) و نیم میکرولیتر معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۰ میکرولیتر سایبرپریمیکس، نیم میکرولیتر رنگ مرجع روکس و آب مقطر استفاده شد. سپس از طریق دستگاه کوربت (RG-6000, Corbett, Australia)، با برنامه زمانی ذیل تکثیر انجام شد و همزمان پایش صورت گرفت.

مرحله اول: واسرشت سازی اولیه: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد

مرحله دوم: واسرشت-اتصال-گسترش؛ ۴۰ چرخه: (۱) ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ (۲) ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ژنی ATG5؛ ۳۳ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ژنی ATG7؛ به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ژن GAPDH

مرحله سوم: به‌منظور ترسیم دمای ذوب، در انتها یک مرحله واکنشی شامل ۴۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد.

کمی‌سازی میزان بیان ژن: تغییرات بیان ژن بر اساس «چند برابر» (Fold Change) محاسبه شد. در ابتدا کارایی پرایمرها و PCR (PCR Efficiency) توسط نرم افزار LinRegPCR به‌صورت مجزا محاسبه شد. منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌هایی که نمودار آن‌ها منطبق با الگو نبود، کنار گذاشته شدند. از طریق معادله Pffafل، بیان نسبی ژن محاسبه شد (Genex16.1).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای ژن‌های مورد پژوهش

نام ژن	۳- شماره دستیابی (Accession)	۵- توالی رفت (Forward) 5'→3'	۶- توالی معکوس (Reverse) 5'→3'	۷- اندازه قطعه تکثیر (bp)	۹- منبع
ATG5	۱۱- ۱۲- NM_053069.6	۱۳- دمای ذوب (Tm): ۶۰/۲۰ محتوای GC: ۴۷ درصد	دمای ذوب (Tm): ۵۹/۲۵ محتوای GC: ۴۳ درصد	۱۲۰	(26)
ATG7	۱۵- ۱۶- NM_001253717.2	۱۷- دمای ذوب (Tm): ۶۰/۱۸ محتوای GC: ۵۵ درصد	۱۸- دمای ذوب (Tm): ۵۸/۶۳ محتوای GC: ۵۲ درصد	۱۰۱	(26)
ژن کنترل -19 (Gapdh)	۲۱- ۲۲- NM_001289726.1	۲۲- دمای ذوب (Tm): ۵۸/۳۵ محتوای GC: ۵۰ درصد	۲۳- دمای ذوب (Tm): ۵۸/۸۳ محتوای GC: ۵۰ درصد	۱۱۳	(27)

۳- آنالیز آماری

از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) برای نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. به‌منظور مقایسه وزن آزمودنی‌ها در گروه‌های پژوهش از آزمون تحلیل واریانس چندگانه (AVONAM) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (SPSS22). برای

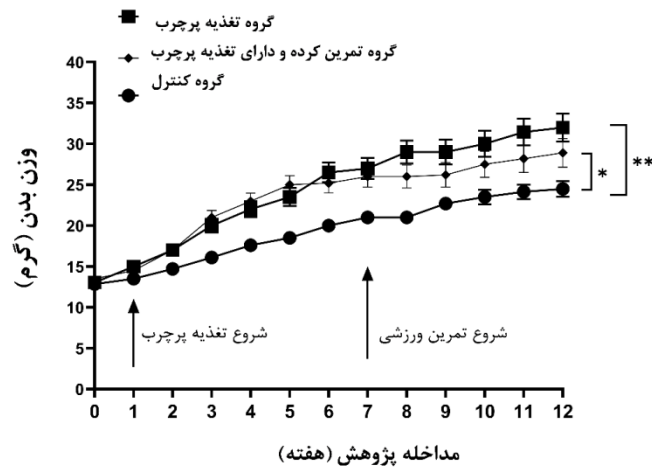
مقایسه بیان ژن های ATG5 و ATG7 در گروه های کنترل، گروه تغذیه و گروه تمرین کرده-تغذیه، از تحلیل واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) در محیط نرم افزار جنیکس استفاده شد (Genex 16.1) سطح معنی داری برای آزمون‌های آماری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

4- نتایج

تغییرات وزن در گروه‌های مورد پژوهش

همان گونه در شکل ۱ قابل مشاهده است؛ افزایش وزن گروه تغذیه پرچرب در مقایسه با افزایش وزن گروه کنترل، ۵۶ درصد بیشتر بود ($P=0.0001$). همچنین میانگین وزن پایانی این گروه $1/3$ برابر وزن گروه کنترل بود ($P=0.003$).

افزایش وزن گروه تمرین-تغذیه در قیاس با افزایش وزن گروه کنترل، ۲۷ درصد بیشتر بود ($P=0.004$). همچنین میانگین وزن پایانی این گروه $1/17$ برابر وزن گروه کنترل بود ($P=0.03$). به علاوه، میانگین وزن پایانی این گروه در قیاس با گروه تغذیه، $1/2$ برابر کمتر بود ($P=0.041$) (شکل ۱).



شکل ۱: تغییر وزن گروه های مورد پژوهش بر اثر اعمال مداخل های تغذیه و تمرین داده‌های نمودار به صورت میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین ارائه شده‌اند.

علامت * بیان گر $P \leq 0.05$ و ** بیانگر $P \leq 0.001$ است.

تغییرات وزن چربی اپیدیدیمال

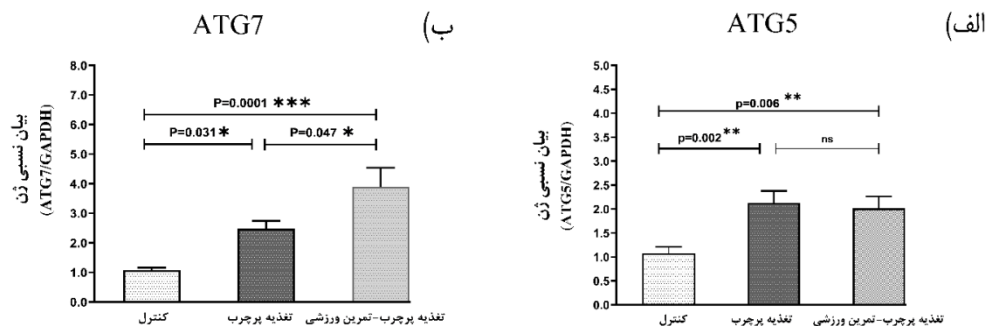
سنجش میزان چربی احشائی نشان داد که میانگین وزن چربی اپیدیدیمال در موش‌های گروه تغذیه پرچرب بیش از دو برابر بود (۱/۱ گرم در مقابل ۰/۴ گرم؛ خطای آلفا: ۰/۰۰۸). همچنین وزن این چربی در گروه تغذیه-تمرین ۰/۷۳ گرم بود که در قیاس با گروه کنترل ۱/۸ برابر بیشتر بود (خطای آلفا: ۰/۰۰۱) و در قیاس با گروه تغذیه پرچرب کمتر بود (۰/۷۲ برابر؛ خطای آلفا: ۰/۰۱۱).

بیان نسبی ژن‌های مربوط به آتوفاژی

میزان بیان ژن‌های ATG5 و ATG7 در بافت چربی موش‌های دارای تغذیه پرچرب بیش از دو برابر گروه کنترل بود (شکل

.۲)

میزان بیان ATG5 در گروه تمرین-تغذیه در قیاس با گروه تغذیه تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۲-الف). با این حال، میزان بیان ATG7 در گروه تمرین-تغذیه در قیاس با گروه تغذیه، ۱/۵ برابر و در قیاس با کنترل نزدیک به چهار برابر، بیشتر بود (شکل ۲-ب).



شکل ۲. بیان نسبی ژن ATG7 و ATG5 در گروه‌های مورد پژوهش (الف) بیان ژن ATG5 و (ب) بیان ژن ATG7 بیان نسبی ژن به صورت چند برابر (fold change) به شکل میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

علامت * بیان گر $P \leq 0.05$ ، ** بیانگر $P \leq 0.01$ و *** بیانگر $P \leq 0.001$ است.

۵- بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که وزن موش‌های گروه تغذیه پرچرب، در مقایسه با کنترل، ۵۰ درصد بیشتر افزایش یافت. مطابق با این یافته، وزن چربی احشائی منطقه اپیدیدیمال در این گروه (تغذیه پرچرب) در قیاس با گروه کنترل بیش از دو برابر بود. بر اساس پژوهش‌های گذشته (۱۹، ۲۸، ۲۹) می‌توان بیان داشت که موش‌های گروه تغذیه پرچرب با این مقدار افزایش وزن و چربی دچار چاقی شده‌اند.

از سوی دیگر، وزن موش‌های که هم‌زمان با مصرف غذای پرچرب، تمرین ورزشی انجام داده بودند، یعنی گروه تمرین-تغذیه، در قیاس با گروه کنترل ۲۷ درصد بیشتر بود و در قیاس با گروهی که صرفاً تغذیه پرچرب داشتند (گروه تغذیه پرچرب)، ۲۲ درصد کمتر بود. هم‌چنین وزن چربی احشائی اپیدیدیمال این گروه در قیاس با گروه کنترل نزدیک به دو برابر بود. با این حال، در قیاس با گروه تغذیه پرچرب، ۳۰ درصد کمتر بود. این یافته دلالت بر این دارد که تمرین ورزشی تجویز شده از افزایش وزن ناشی از غذای پرچرب تا حدی جلوگیری کرد.

در این پژوهش دیده شد که میزان بیان ATG5 و ATG7 در بافت چربی موش‌های دارای تغذیه پرچرب بیشتر (بیش از دو برابر) از گروه کنترل بود. موافق با این یافته، مطالعه‌ای نشان داده است که ۱۶ هفته غذای پرچرب، موجب افزایش میزان پروتئین ATG5-ATG12 در بافت چربی موش می‌شود (۱۶). این یافته‌ها دلالت بر این دارند که بر اثر تغذیه پرچرب طولانی مدت، آتوفازی پایه در بافت چربی احشائی افزایش پیدا می‌کند.

در مقابل، مطالعه‌ای نشان داد که پنج ماه تغذیه با غذای فروکتوز زیاد موجب کاهش بیان mRNA ژن ATG7 در بافت چربی سفید احشائی موش صحرایی شد (۳۰). دلیل اختلاف داده‌های مطالعه حاضر و مطالعه بالا می‌تواند مربوط به تفاوت نوع تغذیه (رژیم غذای پرچرب در مقابل غذای با فروکتوز بالا) و طول مدت تغذیه (کمتر از ۱۶ هفته در مقابل پنج ماه) باشد.

به نظر می‌رسد، تغذیه پرچرب از طریق سازوکار تحریک کننده مربوط به اسیدهای چرب آزاد، بیان ژن‌های آتوفازی را القا می‌کند. تحقیقات نشان داده‌اند، برخی اسیدهای چرب مانند پالمیتیک اسید و اولئیک اسید می‌توانند بیان ژن‌های آتوفازی پایه به ویژه ATG5 و ATG7 را از طریق مسیرهای سیگنالینگ همچون PKC (مسیر مستقل از mTOR) (۳۱) و JNK (مسیر وابسته با mTOR) (۳۲) القا کنند.

بر اساس این یافته‌ها می‌توان پیشنهاد داد که مصرف غذای پرچرب در طولانی مدت که با چاقی همراه می‌شود، قادر است مراحل اولیه آتوفازی را از طریق القاء بیان ژن‌های آتوفازی به‌ویژه ATG5 و ATG7 در بافت چربی سفید فعال کند تا به این ترتیب ذخایر چربی برای انباشت چربی افزایش یابد. این پیشنهاد بر اساس مطالعاتی است که نشان داده‌اند، آتوفازی از طریق تسهیل تمایز سلول‌های چربی در رشد بافت چربی سفید و از این طریق در افزایش مخازن ذخایر چربی نقش مهمی دارد (۳). به‌عبارت ساده‌تر می‌توان بیان داشت که زمانی که غذای پرچرب زیادی مصرف می‌شود، سازوکار افزایش جایگاه ذخایر چربی فعال می‌شوند تا انباشت چربی تسهیل شود و از انباشت نابجا مولکول‌های چربی در بافت‌های دیگر پیش‌گیری شود.

هم‌چنین، مطالعات گذشته نشان داده‌اند که بیان ژن‌های ATG5 و ATG7 در چربی زیرپوستی افراد چاق (۱۵) و همچنین پروتئین ATG5 در چربی احشائی افراد چاق، بیش از میزان آن در افراد غیر چاق است (۱۴). این یافته‌ها نشان می‌دهند که افزایش بیان ژن‌های آتوفازی در بافت چربی افراد چاق الزاماً مرتبط با تغذیه پرچرب نیست و شاید سازوکار تحریک‌کننده دیگری نیز در بیان ژن‌های آتوفازی درگیر باشند.

مطالعات نشان داده‌اند که در شرایط چاقی، عوامل محرکی همچون هایپوکسی (۳۳)، استرس اکسیداتیو (۳۴)، و فاکتورهای التهابی (۳۴) در بافت چربی افزایش می‌یابند. از طرف دیگر اثبات شده است که این عوامل در القای بیان ژن‌های آتوفازی در بافت چربی نقش دارند (۷، ۱۴، ۳۸-۳۵). هم‌چنین، پیشنهاد شده است که مقاومت انسولینی که در شرایط چاقی بروز می‌یابد، باعث کاهش اثر مهارکنندگی انسولین (مسیر mTOR) در بیان ژن‌های آتوفازی می‌شود که حاصل آن افزایش بیان ژن‌های آتوفازی است (۷). در حمایت از این پیشنهاد، مطالعات بر روی رت‌های مدل سندرم متابولیک نشان داده‌اند که عوامل مرتبط با آتوفازی به ویژه ATG5 و ATG7 در بافت چربی سفید موش‌های مقاوم به انسولین افزایش می‌یابد (۳۹، ۴۰).

یافته دیگر این پژوهش نشان داد که میزان بیان ATG5 در گروه تمرین-تغذیه در قیاس با گروه تغذیه تفاوت معنی‌دار نداشت. با این حال، میزان بیان ATG7 در گروه تمرین-تغذیه در قیاس با گروه تغذیه و هم‌چنین در قیاس با کنترل بیشتر بود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که زمانی که تمرین ورزشی با تغذیه پرچرب توأم می‌شود، ژن ATG7 بیشتر بیان می‌شود، دال بر این که تمرین ورزشی می‌تواند آتوفازی ناشی از تغذیه پرچرب را تقویت کند.

در راستای یافته‌ی بالا، تاناکا (Tanaka) و همکاران (۴۱) نشان داده‌اند که بر اثر نه هفته تمرین ورزشی، پروتئین‌های ATG7 در بافت چربی موش‌های صحرایی که تغذیه معمولی داشتند، افزایش یافت. البته در آن مطالعه، مکانیسم‌های مسئول این تغییر شناسایی نشدند.

تصور می‌شود، مکانیسم یا مکانیسم‌های مسئول افزایش آتوفازی پایه در بافت چربی موش‌های گروه تمرین-تغذیه (گروهی که توأم با مصرف تغذیه پرچرب، تمرین ورزشی داشتند) مربوط به کاتابولیسم لیپید ناشی از AMPK است.

کاتابولیسم لیپید در بافت چربی به‌دو روش رخ می‌دهد: ۱. لیپولیز و ۲. لیپوفازی (۴۲). لیپوفازی به مفهوم ساده، تجزیه قطرات لیپید (Lipid Droplets) از طریق سازوکار آتوفازی است که نقش مهمی در تجزیه تری‌گلیسرید بافت چربی دارد (۴۳). مطالعات نشان داده‌اند که سازوکارهای کاتابولیسم لیپید یعنی لیپولیز و لیپوفازی با یکدیگر کاملاً مرتبط هستند (۴۲) و نقطه اتصال تنظیمی بین این سازوکار، AMPK است (۴۲) که اثبات شده است بر اثر تمرین ورزشی تحریک می‌شود (۴۵). بر اساس یافته‌های مطالعات بالا، می‌توان پیشنهاد داد که تمرین ورزشی تجویز شده در این پژوهش احتمالاً از طریق القاء مسیر پیام‌رسانی AMPK، می‌تواند بیان ژن ATG7 (که در لیپوفازی نقش کلیدی دارد) را القا کند.

هم‌چنین، این گمان هست که در شرایطی که تمرین ورزشی با تغذیه پرچرب همراه می‌شود، انباشت و تجزیه تری‌گلیسرید در سلول‌های چربی به‌صورت پی در پی رخ می‌دهند. در این شرایط، فعل و انفعال لیپونز، و از سوی دیگر فعل و انفعال لیپولیز و لیپوفازی بیشتر درگیر می‌شوند که احتمالاً با افزایش میزان آتوفازی همراه می‌شود (۴۶). چراکه در این حالت، احتمال استهلاک اندامک‌های درون سلولی و انباشت ماکرومولکول‌های زیستی (که خود محرک آتوفازی هستند) افزایش می‌یابد (۴۶، ۴۷). از این حیث، می‌توان پنداشت که تاثیر فزاینده ناشی از ترکیب تغذیه پرچرب و تمرین ورزشی در بیان

ATG7 (فاکتور مهم در اتوفاژی) احتمالاً مربوط به تعاملات متابولیکی پیچیده مرتبط با آنابولیسم و کاتابولیست متوالی لیپید در بافت چربی است. با این حال، این نظریه نیاز به تحقیقات بیشتری در آینده دارد.

۶- نتیجه‌گیری

تغذیه پرچرب موجب افزایش تنظیمی بیان ژن‌های عوامل کلیدی مرتبط با اتوفاژی پایه یعنی ATG5 و ATG7 در بافت چربی می‌شود و تمرین منظم ورزشی میزان افزایش بیان ژن ATG7 ناشی از تغذیه پرچرب را تقویت می‌کند. تصور می‌شود که توام شدن تمرین ورزشی و تغذیه پرچرب موجب تحریک بیشتر سازوکار اتوفاژی در بافت چربی می‌شود.

7- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از سرکار خانم دکتر فاطمه جلالی مقیم در همراهی اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی، از جناب آقای یزدان فروتن به سبب همراهی در اجرای فاز مداخلاتی پژوهش و از جناب آقای دکتر علی پوینده به سبب ارائه مشاوره‌های سازنده در اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی در قالب طرح پژوهشی انجام شده است (کد سمات: ۱۵۶۶۴-۱۳۸۲۹).

هم‌چنین روش نگهداری و اعمال مداخله در مورد آزمودنی‌های حیوانی این پژوهش بر اساس دستورالعمل کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی و تاییدیه کمیته اخلاق ذیل معاونت پژوهشی دانشگاه آیت اله بروجردی انجام شد.

8- منابع

1. Mizushima N, Physiological functions of autophagy, in *Autophagy in infection and immunity*. 2009, Springer. p. 71-84.
2. Rabinowitz JD and White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010; 330 (6009): 1344-1348.
3. Zhang Y, Zeng X, and Jin S. Autophagy in adipose tissue biology. *Pharmacological research*. 2012; 66 (6): 505-512.
4. Maixner N, Kovsan J, Harman-Boehm I, Blüher M, et al. Autophagy in adipose tissue. *Obesity facts*. 2012; 5 (5): 710-721.
5. Romero M and Zorzano A. Role of autophagy in the regulation of adipose tissue biology. *Cell Cycle*. 2019; 18 (13): 1435-1445.
6. Menikdiwela KR, Ramalingam L, Rasha F, Wang S, et al. Autophagy in metabolic syndrome: breaking the wheel by targeting the renin-angiotensin system. *Cell Death & Disease*. 2020; 11 (2): 1-17.
7. Zhang Y, Sowers JR, and Ren J. Targeting autophagy in obesity: from pathophysiology to management. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018; 14 (6): 356-376.
8. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2009; 117 (06): 241-250.
9. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20 (9): 2358.
10. Nuñez C, Rodrigues V, Gomes F, De Moura R, et al. Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *International journal of obesity*. 2013; 37 (11): 1473-1480.
11. Yang Z and Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 2009; 335 1-32.
12. Nakamura S and Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *Journal of cell science*. 2017; 130 (7): 1209-1216.
13. Mizushima N. The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 2020; 63 1-10.
14. Kovsan J, Blüher M, Tarnovscki T, Klötting N, et al. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011; 96 (2): E268-E277.
15. Xu Q, Mariman EC, Roumans NJ, Vink RG, et al. Adipose tissue autophagy related gene expression is associated with glucometabolic status in human obesity. *Adipocyte*. 2018; 7 (1): 12-19.

16. López-Vicario C, Alcaraz-Quiles J, García-Alonso V, Rius B, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: role for omega-3 epoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112 (2): 536-541.
17. Poirier P and Després J-P. Exercise in weight management of obesity. *Cardiology clinics*. 2001; 19 (3): 459-470.
18. O'Gorman DJ and Krook A. Exercise and the treatment of diabetes and obesity. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*. 2008; 37 (4): 887-903.
19. Cummins TD, Holden CR, Sansbury BE, Gibb AA, et al. Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2014; 307 (3): E262-E277.
20. Aldiss P, Lewis JE, Lupini I, Bloor I, et al. Exercise training in obese rats does not induce browning at thermoneutrality and induces a muscle-like signature in brown adipose tissue. *Frontiers in endocrinology*. 2020; 11 97.
21. Shirkhani S, Marandi SM, Kazeminasab F, Esmaeili M, et al. Comparative studies on the effects of high-fat diet, endurance training and obesity on Ucp1 expression in male C57BL/6 mice. *Gene*. 2018; 676 16-21.
22. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, et al. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine*. 2001; 51 (5): 443-456.
23. Teixeira-Coelho F, Fonseca CG, Barbosa NHS, Vaz FF, et al. Effects of manipulating the duration and intensity of aerobic training sessions on the physical performance of rats. *PloS one*. 2017; 12 (8): e0183763.
24. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, and Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007; 14 (6): 753-760.
25. Wang Y, Wisloff U, and Kemi OJ. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiological research*. 2010; 59 (5): 633.
26. Deng Y, Xu J, Zhang X, Yang J, et al. Berberine attenuates autophagy in adipocytes by targeting BECN1. *Autophagy*. 2014; 10 (10): 1776-1786.
27. Parousis A, Carter HN, Tran C, Erlich AT, et al. Contractile activity attenuates autophagy suppression and reverses mitochondrial defects in skeletal muscle cells. *Autophagy*. 2018; 14 (11): 1886-1897.
28. Hariri N and Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*. 2010; 23 (2): 270-299.
29. Lang P, Hasselwander S, Li H, and Xia N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 1-14.
30. Äijälä M, Malo E, Ukkola O, Bloigu R, et al. Long-term fructose feeding changes the expression of leptin receptors and autophagy genes in the adipose tissue and liver of male rats: a possible link to elevated triglycerides. *Genes & nutrition*. 2013; 8 (6): 623-635.
31. Tan SH, Shui G, Zhou J, Li JJE, et al. Induction of autophagy by palmitic acid via protein kinase C-mediated signaling pathway independent of mTOR (mammalian target of rapamycin). *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287 (18): 14364-14376.
32. Komiya K, Uchida T, Ueno T, Koike M, et al. Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic β -cells via JNK pathway. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2010; 401 (4): 561-567.
33. Trayhurn P, Wang B, and Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition*. 2008; 100 (2): 227-235.
34. Sell H and Eckel J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2010; 13 (4): 366-370.
35. Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine*. 2011; 56 (2): 140-144.
36. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular & Cellular Biology*. 2009; 29 (10): 2570-2581.
37. Wang Y, Singh R, Xiang Y, and Czaja MJ. Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy are required for hepatocyte resistance to oxidant stress. *Hepatology*. 2010; 52 (1): 266-277.
38. Joven J, Guirro M, Mariné-Casadó R, Rodríguez-Gallego E, et al. Autophagy is an inflammation-related defensive mechanism against disease. *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases-Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics*. 2014; 43-59.
39. Kosacka J, Koch K, Gericke M, Nowicki M, et al. The polygenetically inherited metabolic syndrome of male WOKW rats is associated with enhanced autophagy in adipose tissue. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2013; 5 (1): 23.
40. Kosacka J, Nowicki M, Paeschke S, Baum P, et al. Up-regulated autophagy: as a protective factor in adipose tissue of WOKW rats with metabolic syndrome. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2018; 10 (1): 13.
41. Tanaka G, Kato H, and Izawa T. Endurance exercise training induces fat depot-specific differences in basal autophagic activity. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2015; 466 (3): 512-517.

42. Zechner R, Madeo F, and Kratky D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017; 18 (11): 671-684.
43. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009; 458 (7242): 1131-1135.
44. Singh R and Cuervo AM. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *International journal of cell biology*. 2012; 2012
45. Steinberg GR and Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nature reviews Drug discovery*. 2019; 18 (7): 527-551.
46. Kaur J and Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015; 16 (8): 461-472.
47. Li Y, Zong W-X, and Ding W-X. Recycling the danger via lipid droplet biogenesis after autophagy. *Autophagy*. 2017; 13 (11): 1995-1997.