



The effect of twelve weeks of high-intensity interval training and L-carnitine supplementation on gene expression of some factors associated with browning of white adipose tissue and Uncoupling protein-1 changes in obese male rats

Vahid Sari Saraf^{1*}, Mostafa Khani², Mehdi Saghi³

1- Professor Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3- Ph.D.Candidate, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Abstract

Background and Aim: Increasing the activity of uncoupled protein type 1 (UCP1) reduces the complications of obesity. The aim of the present study was to investigate the effect of twelve weeks of high-intensity interval training (HIIT) and L-carnitine supplementation on the expression of miR-455, HIF-1 α , and UCP1 changes in subcutaneous adipose tissue of obese male rats. **Methods:** Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into four groups after 8 weeks of weeks of obesity induction: Control (C), Training (T), Supplement (S), and Supplement+Training (ST). The protocol of HIIT with 85-90% of the maximum speed on the treadmill, 5 days a week for 12 weeks, was performed for T and ST group rats. S and ST groups rats were gavage with L-carnitine 30 mg/kg body weight daily for three months. Mir-455 expression, HIF-1 α and UCP1 were assessed by RT-qPCR, western blot and immunofluorescence respectively. Dependent t-tests and One-way analysis of variance at a significance level of $p < 0.05$ used for group comparisons and Benferroni's post hoc test as appropriate to determine the significance level. **Results:** The weight of rats increased during the obesity period ($p = 0.001$), which was reduced by exercise ($p = 0.003$) and Supplementation+Training ($p = 0.001$). The expression of miR-455 gene in T group significantly decreased ($p = 0.001$) and S group significantly increased ($p = 0.001$) compared to group C and ST group increased non-significantly ($p = 0.071$). The expression of HIF-1 α Protein between groups S, T and ST increased significantly ($p = 0.001$) compared to group C. UCP1 protein expression was significantly increased in all groups compared to group C ($p = 0.001$). **Conclusion:** HIIT and the combination of HIIT with L-carnitine appear to be a useful strategy for combating obesity and provide promising evidence for promoting browning of white adipose tissue. While further research is needed to generalize of these findings from animal models to human applications.

Keywords: microRNA-455, Hypoxia-inducible factor 1 α inhibitor , Uncoupling protein-1 , L-carnitine, high intensity interval training.

Corresponding Author, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Post Code: 5166616471

Email: sarraf@tabrizu.ac.ir



تأثیر دوازده هفته تمرین تناوبی با شدت بالا و مکمل دهی ال کارنیتین بر بیان ژن برخی عوامل مرتبط با تغییر بافت چربی سفید به قهوه‌ای و پروتئین جفت نشده نوع-1 در رت‌های نر چاق

وحید ساری صراف*^۱، مصطفی خانی^۲، مهدی ساقی^۳

- ۱- استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
- ۲- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
- ۳- دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: افزایش فعالیت پروتئین جفت نشده نوع یک (UCP1) باعث کاهش عوارض چاقی می‌شود. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر دوازده هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) و تجویز مکمل ال کارنیتین بر بیان miR-455، HIF-1α و تغییرات UCP1 در بافت چربی زیر پوستی رت‌های نر چاق بود. **روش تحقیق:** سی و شش سر رت نر ویستار پس از هشت هفته مصرف غذای پرچرب به طور تصادفی به چهار گروه: کنترل (C)، تمرین (T)، مکمل (S) و مکمل+تمرین (ST) تقسیم شدند. HIIT با شدت ۸۵-۹۰٪ سرعت بیشینه روی نوارگردان، پنج روز در هفته به مدت ۱۲ هفته برای رت‌های گروه T و ST اجرا شد. رت‌های گروه S و ST روزانه به مدت سه ماه ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن با ال کارنیتین گاوآژ شدند. بیان miR-455، HIF-1α و UCP1 به ترتیب با استفاده از روش‌های RT-qPCR، وسترن بلات و ایمنوفلورانس ارزیابی شدند. از آزمون‌های t وابسته و آنالیز واریانس یک راه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و برای تعیین جایگاه معنی‌داری از آزمون تعقیبی بونفرونی در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ استفاده شد. **یافته‌ها:** وزن رت‌ها در دوره چاقی افزایش داشت ($p = 0.001$) که با تمرین ($p = 0.003$) و مکمل+تمرین ($p = 0.001$) کاهش یافت. بیان ژن miR-455 گروه‌های T کاهش معنی‌دار ($p = 0.001$)، S افزایش معنی‌دار ($p = 0.001$) و ST افزایش غیرمعنی‌داری ($p = 0.071$) در مقایسه با گروه C داشتند. بیان پروتئین HIF-1α در همه گروه‌ها نسبت به گروه C افزایش معنی‌دار ($p = 0.001$) داشت. بیان پروتئین UCP1 در همه گروه‌ها نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشت ($p = 0.001$). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد HIIT و همزمانی HIIT با ال کارنیتین استراتژی مفیدی برای مقابله با چاقی بوده و شواهد امیدوارکننده‌ای برای ترویج قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید ارائه می‌دهد. در حالی که تحقیقات بیشتری برای تعمیم این یافته‌ها از مدل‌های حیوانی به کاربردهای انسانی مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: microRNA-455، فاکتور یک القا شونده هیپوکسی آلفا (HIF-1α)، پروتئین جفت نشده نوع-1 (UCP1)، ال-کارنیتین و تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT)

* نویسنده مسئول، تبریز، دانشگاه تبریز، گروه فیزیولوژی ورزش، کدپستی ۵۱۶۶۶۱۶۴۷۱

پست الکترونیکی: sarraf@tabrizu.ac.ir



مقدمه

چاقی عامل اصلی سندرم متابولیک و اختلالاتی مانند دیابت نوع ۲، بیماری‌های قلبی عروقی و برخی سرطان‌ها است، در این بین، عملکرد صحیح بافت چربی^۱ یک عامل کلیدی برای سلامت متابولیکی است و مقدار مناسب آن به کاهش عوارض چاقی منجر می‌شود. بافت چربی سفید زیر جلدی^۲ امکان است اثرات مفیدی بر هموستاز انرژی داشته باشد (۱)، چرا که بافت چربی سفید^۳ جمع‌آوری چربی اضافی در خون سبب کاهش تجمع چربی و آسیب در برخی اندامها نظیر قلب، کبد و کلیه می‌شود (۲)، اما این افزایش تجمع چربی ممکن است باعث ایجاد التهاب و عوارض ناشی از آن شود. همچنین از بین دو نوع سلول چربی، سلول‌های چربی سفید در ذخیره‌سازی انرژی و سلول‌های چربی قهوه‌ای (بژ یا بریت^۴ که هر دو بیانگر پروتئین جفت نشده نوع یک می‌باشند) در مصرف انرژی به صورت گرمایی نقش داشته و می‌تواند با چاقی مقابله کند (۳). در این میان عوامل بالادستی متعددی می‌توانند در تنظیم مثبت یا منفی WAT^۵ و تبدیل آن به قهوه‌ای نقش داشته باشند که شناسایی میکروآر ان ای‌ها^۶ و نوع فعالیت-شان از آن جمله‌اند.

microRNAها، دسته‌ای از RNAهای کوتاه غیر کدکننده و یک عامل مهم فرآیندهای بیولوژیکی متنوع در تنظیم بیان ژن مانند توسعه، بیماری‌ها و ایجاد هویت سلولی هستند (۴). در این بین، miR-۴۵۵ از جمله microRNAهایی است که با تنظیم‌کننده‌های عوامل چربی‌زا، تمایز سلول‌های چربی قهوه‌ای را تعدیل می‌کند. آدیپوزن قهوه‌ای فرآیند پیچیده‌ای است که نیاز به هماهنگی تنظیم‌کننده‌های متعدد و مسیرهای سیگنالینگ دارد. miR-۴۵۵ که چندین تنظیم‌کننده چربی‌زای کلیدی مانند نکدین^۸، رانکس^۹ و فاکتور یک القا شونده هیپوکسی آلفا^{۱۰} را هدف قرار می‌دهد (۵). با افزایش تجمع چربی و فشرده شدن عروق و کاهش اکسیژن AT نه تنها التهاب در WAT افزایش می‌یابد، بلکه HIF-1 α نیز برای مقابله با التهاب و هیپوکسی افزایش خواهد یافت. از دیگر وظایف HIF-1 α می‌توان به فعالیت در تنظیم متابولیسم AT اشاره کرد (۶). miR-۴۵۵ به عنوان یک عامل بالا دستی HIF-1 α و تنظیم‌کننده جدید چربی‌زایی قهوه‌ای توسط سرما و پروتئین مورفونژنیک استخوان^{۱۱} بیان می‌شود. مطالعات آزمایشگاهی (فعال کننده‌ها^{۱۲} و بلاک کننده‌ها^{۱۳}) نشان می‌دهد که miR-۴۵۵ تمایز سلول‌های چربی قهوه‌ای را از طریق مهار HIF-1 α افزایش داده و کیناز فعال شونده با آدنوزین مونوفسفات یک آلفا^{۱۴} را فعال می‌کند. این امر منجر به افزایش بیان دو عامل کلیدی گیرنده فعال شده با تکثیر کننده پراکسی زوم گاما کواکتیوتور یک آلفا^{۱۵} و گیرنده گامای فعال شده با تکثیر کننده پراکسی زوم گاما^{۱۶} در SWAT

1 Adipose Tissue (AT)

2 Subcutaneous white adipose tissue (SWAT)

3 white adipose tissue (WAT)

4 Beige

5 Britte

6 Uncoupling protein-1 (UCP1)

7 microRNA

8 Nectin

9 Runx1t1

10 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor (HIF-1 α)

11 Bone Morphogenetic Proteins 7 (BMP7)

12 Activators

13 Blockers

14 Adenosine monophosphate-activated protein kinase-1 alpha (AMPK-1 α)15 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α)



می‌شود که نتیجه آن افزایش بیوژنز میتوکندری موجود در UCP1 است که نقش آن در ترموژنز و گرمایی بدون لرز و افزایش مصرف انرژی مشهود است (۴، ۵، ۷).

UCP1 در sWAT با محرک‌هایی ظاهر می‌شوند (۸). دسته‌ای از این محرک‌ها غذایی (۹)، تمرینات ورزشی (۱۰) یا دارویی (۱۱) است.

مکمل‌های خوراکی مانند ال کارنیتین‌آدر تغییر فنوتیپ WAT به بژ یا قهوه‌ای و افزایش فعالیت میتوکندری آنها مؤثرند. ال کارنیتین نقش اساسی در انتقال اسیدهای چرب با زنجیره طولانی به میتوکندری‌ها برای فرآیند بتااکسیداسیون دارد که با کاهش میزان ال کارنیتین در سلول‌ها انتقال اسیدهای چرب با زنجیره طولانی برای فرآیند بتااکسیداسیون با اختلال مواجه شده و باعث افزایش بیش از حد چربی در کبد، عضله قلب و اسکلتی شده و در نهایت باعث میوپاتی و هیپاتومگالی می‌شود. تجویز ال کارنیتین باعث بهبود میزان بیان انتقال اسیدهای چرب با زنجیره طولانی به داخل میتوکندری شده و افزایش بیان UCP1 را در موش‌های استئاتوز احشایی در پی خواهد داشت. این امر منجر به بهبود مورفولوژیکی WAT شده و بیان UCP1 را در آن نیز به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد که از لحاظ میکروسکوپی WAT شبیه به BAT شده و ترموژنز و مصرف انرژی در آن افزایش خواهد یافت (۱۲). ولی در خصوص اثر ال کارنیتین بر miR-۴۵۵ و HIF-1 α شواهدی یافت نشده است. از طرفی تمرینات ورزشی نه تنها به عنوان یک ابزار درمانی برای کاهش عوارض بی‌حرکی مورد تأیید واقع شده (۱۳)، بلکه به عنوان محرک غیردارویی در کاهش وزن و عوارض چاقی و تغییر فنوتیپ WAT به بژ و فعال سازی BAT مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این بین، تمرینات تناوبی با شدت بالا به دلیل اثرات مفید و طولانی‌تر در دوره تمرین و بعد از آن مورد تأکید بیشتری قرار گرفته است (۱۴، ۱۵). تمرینات ورزشی با افزایش فعالیت مسیره‌های گوناگونی نظیر فیبرونکتین ۳ دامنه حاوی پروتئین ۵ آیریزین^۵ و AMPK-1 α /PPAR- γ /PGC-1 α (۱۶) و کاهش HIF-1 α به واسطه کاهش میزان AT موجب فعال سازی و تغییر مورفولوژیکی WAT به BAT می‌شود (۱۷)، ولی هنوز تأثیرات فیزیولوژیکی HIIT و ال کارنیتین که به واسطه آنها عملکرد بافت‌های گوناگون با مولکول‌های جدید نظیر microRNA بهبود یابد در هاله‌ای از ابهام قرار دارد، لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر ۱۲ هفته انجام HIIT و مصرف ال کارنیتین بر بیان محور miR-۴۵۵/HIF-1 α /UCP1 در رت‌های نر چاق بود، نتایج این مطالعه ممکن است پتانسیل تبیین مکانیسم‌های جدید زیربنایی تنظیم متابولیک را با صرف حداقل هزینه و وقت داشته باشد تا راه را برای استراتژی‌های درمانی نوآورانه چاقی و اختلالات متابولیک برای بهبود فرآیند اکسایش چربی در حین تمرین و بعد از آن در بافت چربی قهوه‌ای^۶ هموار کند.

روش تحقیق

نمونه آماری و روش نگهداری: پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق زیست پزشکی دانشگاه تبریز بررسی و با شناسه IR.TABRIZU.REC.1401.042 تأیید و ثبت گردید. این پژوهش به روش تجربی در آزمایشگاه حیوانات با ۴۰ سر رت نر ویستار (شش هفته‌ای) با میانگین وزنی 12 ± 180 گرم انجام شد و در نهایت ۳۶ سر از رت‌ها وارد مرحله نهایی مطالعه شدند. رت‌ها در قفس‌های پلی‌کربنات (سه سر در هر قفس) در شرایط یکسان و مطلوب حیوانات آزمایشگاهی با چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲، رطوبت نسبی $50 \pm 3\%$ و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

1 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ)

2 L-carnitine

3 High-intensity interval training (HIIT)

4 Fibronectin type III domain-containing protein 5

5 Irisin

6 Browne Adipose Tissue (BAT)



روش القای چاقی: پس از یک هفته آشنایی رت‌ها با محیط آزمایشگاه به مدت هشت هفته رژیم غذای پرچرب حاوی ۶۰٪ چربی، ۲۰٪ کربوهیدرات و ۲۰٪ پروتئین استفاده شد (۱۵) تا وزن رت‌ها به حدود ۴۵۰ گرم رسید (شکل ۱-۱). سپس رت‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل (C)، تمرین (T)، مکمل ال‌کارنیتین (S) و مکمل ال‌کارنیتین+تمرین (ST) تقسیم شدند. جهت تهیه غذای پرچرب روزانه پلت‌ها خرد شده سپس با چربی دنبه مخلوط و مجدد به پلت تبدیل شد تا از اکسید شدن آن جلوگیری شود. پس از القای چاقی رت‌ها به صورت آزادانه با غذای استاندارد حاوی ۱۰٪ چربی، ۷۰٪ کربوهیدرات و ۲۰٪ پروتئین تغذیه شدند (۱۵)، همچنین با حذف غذای پرچرب و مصرف غذای استاندارد و محدودیت کالری ناشی از آن در همه گروه‌ها میزان مصرف غذا یکنواخت در نظر گرفته شد تا شرایط برای تمامی گروه‌ها یکسان باشد. میزان غذای مصرفی با وزن‌کشی، ثبت و کنترل شد. خوراک استاندارد چونندگان از شرکت به‌پرور تهیه شد.

روش تمرین: رت‌های گروه‌های T و ST به مدت پنج روز با سرعت ده متر در دقیقه از پنج تا ده دقیقه در شیب صفر تمرین کردند تا با شیوه دویدن روی نوارگردان آشنا شوند. همچنین جهت ایجاد شرایط مساوی رت‌های گروه‌های C و S به مدت پنج روز در هفته به مدت ۱۵ دقیقه بر روی نوارگردان بدون حرکت قرار گرفتند. در نهایت از آزمون استاندارد بدفورد^۱ (۱۸) جهت تعیین سرعت بیشینه استفاده شد. این آزمون شامل ده مرحله سه دقیقه‌ای بود که رت‌ها باید با سرعت پنج متر در دقیقه در شیب ۲۵ درجه شروع به دویدن کرده و هر مرحله پنج متر (معادل ۱/۶۷ متر در هر دقیقه) تا زمان رسیدن به واماندگی به سرعت آنان افزوده شد. شاخص واماندگی با ایجاد شوک مکرر یا امتناع رت از دویدن مشخص شد. از حداقل شوک برای تحریک رت‌ها استفاده می‌شد. بر این اساس سرعت رت‌ها از حدود ۱۱/۵ متر به سرعت ۲۱/۷۰ متر رسید. پروتکل اصلی HIIT پنج روز در هفته به مدت ۱۲ هفته (شامل: پنج دقیقه گرم کردن و پنج دقیقه سرد کردن با دویدن بر روی نوارگردان با شدت کمتر از ۶۰٪ سرعت بیشینه، ده وهله چهار دقیقه‌ای ۸۵-۹۰٪ سرعت بیشینه با استراحت فعال دو دقیقه‌ای بین هر وهله معادل ۵۰-۶۰٪ سرعت بیشینه بر روی نوارگردان بدون شیب) بود (۱۵). همچنین هر دو هفته یکبار آزمون تعیین سرعت دویدن رت‌های گروه‌های T و ST در یک روز غیر تمرین گرفته شد تا از شدت یکسان در طول جلسات تمرین جلوگیری شده و بار اضافی اعمال گردد (شکل ۱-۱).

روش مصرف ال‌کارنیتین: ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ال‌کارنیتین مایع (سوسی‌فارم-ایتالیا) در شبانه روز (۲۰) به مدت ۱۲ هفته یک ساعت بعد از تمرین (۲۱) بین ساعت ۱۷-۱۹ در گروه‌های S و ST گاوژ شد. برای گروه‌های C و T نیز محلول آب مقطر ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۲۲) گاوژ شد.

روش تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی: همه رت‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و یک شب ناشیایی با استفاده از کتامین (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایزالین (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و بدون درد با گیوتین قربانی شدند. سپس نمونه بافت چربی زیر پوستی ناحیه اینگوینال^۲ (۲۳) برداشته و به میکروتیوب منتقل و در داخل تانک حاوی نیتروژن مایع قرار داده شده و برای ادامه مراحل آنالیز بیوشیمیایی به آزمایشگاه انتقال یافتند.

میکروریبونوکلیک-۴۵۵ با استفاده از Real-Time qPCR: حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه دریافتی با اضافه کردن محلول تریازول^۴ و با استفاده از گرایندر هموژنیزه و در دوره‌های متفاوت با سانتریفوژ یخچال‌دار (سیگما‌آلدریچ، آمریکا) سانتریفوژ شد. سپس رسوب با Dry Bath انجام شد و RNAها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شده تا در آب حل شوند.

1Bedford

2So.Se PHARM , Italy

3Inguinal

4Triazole

5Sigma-Aldrich+USA



بعد از آن غلظت نمونه با استفاده از دستگاه نانودراپ^۱ (ترمو، آمریکا) در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. بعد از اطمینان از عدم وجود آلودگی فنولی و تعیین غلظت و خلوص RNAهای استخراج شده، اقدام به سنتز cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت (سیگماآلدریچ، آمریکا) شد. برنامه تکثیر ریبونوکلیک با چرخه زمانی دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه پنج ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ثانیه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. سپس به کمک پرایمر اختصاصی ژن‌ها و بر اساس آنزیم ترانسکریپتاز معکوس اولین رشته از cDNA از روی RNAها کل استخراج شد. در نهایت برای کمی سازی بیان ژن از فرمول $C=2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. پرایمر ژن miR-۴۵۵ (ژن هدف) و U6 (ژن مرجع) به عنوان کنترل داخلی (لایت سایکلر، آلمان) تعیین و با استفاده از نرم‌افزار اولیگو-۷ طراحی گردید (جدول ۱ و شکل ۲).

miR-455 forward: GCAGTCCACGGGCATATACACT, reverse: 5' CACCACTGCCATCCCAC A-3',
U6 forward, 5'-CGCTTCGCGCAGCACATATACTA-3', reverse, 5'-CGCTTCACGAATTTGC G TGTC A-3'

بیان پروتئین HIF-1 α با استفاده از روش وسترن بلات: با استخراج پروتئین‌ها از بافت‌ها و کشیدن منحنی استاندارد و تهیه غلظت‌های مختلف BSA در طول موج ۶۳۰ نانومتر با روش بردفرد انجام شد. سپس پروتئین‌ها در ژل آکریلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات^۷ با الکتروفورز تفکیک شد. مرحله بلاکینگ^۸ و جلوگیری از واکنش غیر اختصاصی آنتی بادی اولیه با محلول دو درصد شیر خشک بدون چربی در بافر تراپس سالین با ۲۰^۹ صورت گرفت. بعد از انتقال پروتئین‌ها بر سطح کاغذ پلیمر پلی-وینیلیدین دی‌فلوراید^{۱۰} مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه بتا‌اکتین^{۱۱} (sc-47778, 1: 300) به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت و جایگزینی آن با آنتی‌بادی‌های HIF-1 α (28b): sc-13515:1:200 و انکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه خرگوش^{۱۲} با غلظت (1:1000) انجام شد و در نهایت بر روی فیلم رادیوگرافی به ظهور رسیدند. چگالی باندها با نرم‌افزار دانسیومتری (تصویربرداری جی، آمریکا)^{۱۳} نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲ تعیین شد (شکل ۳).

تصویر برداری و شمارش UCP1 با استفاده از روش ایمنوفلورانس: نمونه‌های WAT تعبیه شده در پارافین با استفاده از میکروتوم^{۱۴} با پنج میکرومتر برش داده شده و بر روی لام‌های شیشه‌ای نصب شدند. سپس لام‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با پلی‌اتیلین‌آمین پوشانیده و در نهایت با H₂O استریل شستشو داده شد. بعد از خشک شدن کامل لام‌ها زیر نور UV حداقل به مدت چهار ساعت استریل و برای مدت کوتاهی در بافر سالین فسفات^{۱۵} شستشو داده شد. جهت تثبیت از پارافورمالدئید چهار درصد در PBS pH7.4 به مدت ده دقیقه در دمای اتاق استفاده شد، سپس سلول‌ها سه بار با PBS سرد شسته شد. جهت رنگ آمیزی، لام‌ها با یک درصد BSA، ۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلیسین PBST به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند تا اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی‌ها مسدود شود و در آنتی بادی UCP1 (sc-293418) رقیق شده یک درصد با BSA شسته، سپس با آنتی بادی ثانویه

1 Nano Drop

2 Thermo, USA

3 Sigma Aldrich, USA

4 Light Cycler 96, German

5 Oligo-7

6 Western blot

7 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

8 Blocking

9 Tris-Buffered Saline with Tween 20 (TBS -T)

10 Polyvinylidene difluoride (PVDF)

11 β -actin

12 Anti Rabbit

13 Image J, Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

14 Microtome

15 phosphate-Buffered saline (PBS)



انکوبه و سه بار با PBS به مدت پنج دقیقه در تاریکی شستشو شد و در ۱٪ تریتون X نفوذ پذیر شده و در آلومین پلاسمای گاو سه درصد در PBS انکوبه شدند. در نهایت لامها شستشو و ورقه‌ها برای جلوگیری از خشک شدن در زیر میکروسکوپ با لاک ناخن روکش شده و در تاریکی در دمای ۲۰- تا ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری و تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Image J ۱.42q از هر نمونه گرفته و شمارش شد، سپس یک نمونه از هر گروه به صورت تصادفی و دستی جهت صحت سنجی بازشمارش شد تا اطمینان لازم از تصاویر و مقادیر UCP1 بدست آید (شکل ۴ و ۵).

روش‌های آماری: برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون شاپیروویک، بررسی همگنی واریانس‌ها از آزمون لون^۱ و برای توصیف داده‌ها از میانگین و انحراف استاندارد استفاده شد. برای بررسی درون گروهی داده‌ها از آزمون t وابسته استفاده شد. داده‌های خام UCP1 بدست آمده با ایمنوفلورانس با روش فولد چنج^۳ به صورت نسبی با گروه C محاسبه شد. در نهایت آنالیز واریانس یک راهه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و برای تعیین جایگاه معنی‌داری از آزمون تعقیبی بونفرونی^۴ استفاده شد. کلیه روش‌های آماری با نرم‌افزار SPSS^{۲۶} در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ < p انجام شد. رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel 2007 صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج آزمون شاپیروویک نشان داد که توزیع وزن تمامی رت‌ها در ابتدای مطالعه طبیعی است ($p=0/134$)، همچنین آزمون t وابسته نشان داد که وزن تمامی رت‌ها در پایان هشت هفته مصرف غذای پرچرب نسبت به ابتدای مطالعه افزایش یافته است ($t=-109/65, p=0/001$) (شکل A-۱). پس از تقسیم تصادفی رت‌ها به چهار گروه و مداخلات مربوطه، اختلاف معنی‌داری بین وزن گروه‌ها مشاهده شد ($F_{(3,32)} = 2/410, p < 0/05$)، که در این بین، وزن گروه T ($p=0/003$) و ST ($p=0/001$) نسبت به گروه C و گروه T ($p=0/020$) و ST ($p=0/001$) نسبت به گروه S کاهش معنی‌داری داشتند، اما گروه ST ($p=1/000$) نسبت به T و گروه S ($p=1/000$) نسبت به گروه C تغییرات معنی‌داری نداشتند ($p > 0/05$)، اگر چه نتایج نشان از وزن کمتر گروه S نسبت به گروه C و گروه ST نسبت به گروه T در پایان پژوهش داشت (شکل B-۱).

اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در بیان ژن mir-455 مشاهده شد ($F_{(3,32)} = 5/921, p < 0/05$)، در این میان، گروه T نسبت به گروه C کاهش معنی‌دار ($p=0/001$) و گروه S نسبت به گروه C افزایش معنی‌دار ($p=0/001$) داشتند؛ اما گروه ST نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری ($p=0/071$) نداشت. همچنین اختلاف بین سایر جفت گروه‌ها معنی‌دار بود ($p=0/001$)، (جدول ۱ و شکل ۲). از طرفی نتایج بیان HIF-1 α حاکی از وجود اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها بود ($F_{(3,32)} = 9/00, p < 0/05$) به گونه‌ای که گروه‌های T ($p=0/001$)، S ($p=0/001$) و ST ($p=0/001$) نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشتند، همچنین بین سایر جفت گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p=0/001$)، اما بین گروه T نسبت به گروه S اختلاف معنی‌داری ($p=1/000$) مشاهده نشد (جدول ۱ و شکل ۳)، همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در بیان پروتئین UCP1 مشاهده شد ($F_{(3,32)} = 52/722, p < 0/05$)، به طوری که همه گروه‌ها نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشتند ($p=0/001$)، اما بین گروه T نسبت به گروه ST اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/081$)، اگر چه میانگین گروه T نسبت به گروه ST بالاتر بود (شکل ۴).

بررسی تصاویر ایمنوفلورانس و ویژگی‌های AT گروه‌های مختلف نشان داد که گروه C حاوی سلول‌های چربی سفید با قطرات چربی بزرگ و با ماتریکس حباب مانند ناشی از تجمع چربی که واکوئل خالی نشان از سلول چربی بزرگ‌تر است. هسته‌ها کوچک بوده و سلول‌ها میتوکندری کمتری دارند که به سمت خارج سلول رانده شده است. مویرگ‌های کوچک و با دانسیته کم مشاهده می‌شود

1Shapiro-Wilk Test

2Levene-test

3Fold change

4Bonferroni



که حاکی از فعالیت بسیار کم سلول AT است، همچنین سیتوپلاسم فشرده تر نشان از حجم بالای سلول چربی داشت و از هم گسیختگی غشاء در آن دیده می‌شود که این موارد نشان از تغییرات پاتولوژیک در سلول چربی داشت (شکل A-۵) که با افزایش وزن همسو بود (شکل B-۱). از طرفی تصویر گروه T نشان می‌دهد ضمن افزایش تعداد سلول چربی قهوه‌ای و بڑ باعث کاهش حجم سلول‌های چربی نسبت به گروه C شده و سلول‌های چند حفره‌ای با حجم کمتر را به وجود می‌آورد. مویرگ‌ها در آن افزایش یافته و قطرشان بزرگ‌تر شده و در ارتباط بیشتری با سلول بوده که موجب دفع گرما از طریق خون خواهد شد، از طرفی هسته‌ها و میتوکندری‌ها بیشتر و بزرگ‌تر شده که ضمن افزایش حجم سیتوپلاسم حاکی از فعالیت بیشتر سلول چربی بڑ و افزایش مصرف انرژی داشت که با کاهش وزن ثبت شده همسو بود (شکل B-۱)، همچنین تمرین باعث انسجام بافتی بالاتر و غشاء یکنواخت شد که تغییرات منفی بر اثر چاقی را خنثی کرد (شکل B-۵).

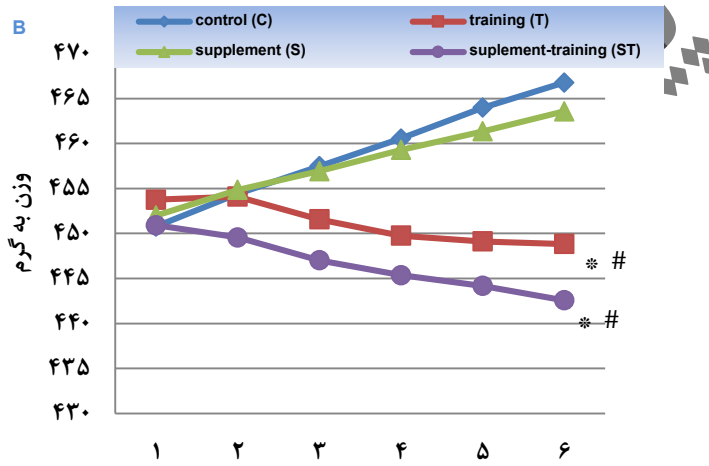
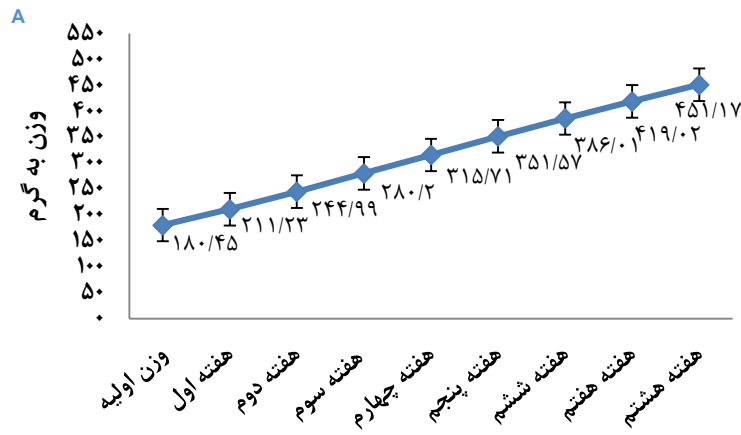
تصویر گروه S نشان می‌دهد که نسبت به سلول‌های AT گروه C تکامل بیشتری یافته و سلول‌ها با قطرات چربی کوچکتر و سیتوپلاسم وسیع‌تری مشاهده می‌شود. ضمن آن که هسته‌ها و میتوکندری‌ها بیشتر شده و مویرگ‌ها با قطر بیشتر دیده می‌شود، اما نسبت به گروه T تکامل یافته‌تر نیست که با توجه به مصرف انرژی کمتر در این گروه وزن بیشتری نسبت به گروه T ثبت شد (شکل B-۱)، همچنین انسجام بافتی کمتری نسبت به گروه T داشتند (شکل D-۵).

تصویر گروه ST نسبت به گروه C و S نشان داد که ضمن افزایش تعداد سلول چربی قهوه‌ای باعث کاهش حجم سلول‌های چربی شده و سلول‌های چند حفره‌ای با حجم کمتر را به وجود می‌آورد. مویرگ‌ها در آنها افزایش یافته و قطرشان بزرگ‌تر شده و در ارتباط بیشتری با سلول بوده که موجب دفع گرما از طریق خون خواهد شد. هسته‌ها و میتوکندری‌ها بیشتر و بزرگ‌تر شده که ضمن افزایش حجم سیتوپلاسم حاکی از فعالیت بیشتر سلول BAT و بڑ است که مصرف انرژی در آنها افزایش یافته است که تغییرات نشان از حالت کاتابولیک ناشی از تمرین و مصرف کربنیتین داشت و با کاهش وزن ثبت شده همسو بود (شکل B-۱)، از طرفی این تغییرات نشان از شکل‌گیری UCP1 با درصد بیشتر نسبت به گروه C بود که تصاویر حاکی از انسجام بافتی بیشتر نسبت به گروه S داشت، اما در مقایسه با گروه T انسجام بافتی کمتری مشاهده شد (شکل E-۵).

جدول ۱. توصیف متغیرها در چهار گروه پژوهش

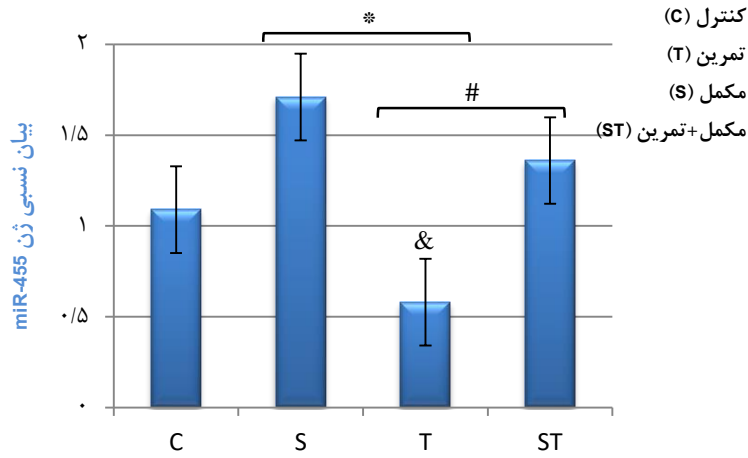
UCP1	HIF-1 α	miR-۴۵۵	متغیرها
انحراف معیار \pm میانگین	انحراف معیار \pm میانگین	انحراف معیار \pm میانگین	گروه‌ها
۱/۰ \pm ۰/۰۰	۱/۰ \pm ۰/۰۰	۱/۰ \pm ۰۹/۳۲	کنترل (C)
۱/۰ \pm ۸۵/۳۰	۱/۰ \pm ۴۲/۰۳	۱/۰ \pm ۷۱/۲۲	مکمل (S)
۲/۰ \pm ۸۰/۲۲	۱/۰ \pm ۳۹/۱۲	۰/۰ \pm ۵۸/۱۳	تمرین (T)
۲/۰ \pm ۵۶/۱۱	۱/۰ \pm ۶۲/۱۳	۱/۰ \pm ۳۶/۰۰۴	مکمل + تمرین (ST)

miR-۴۵۵ و HIF-1 α بر حسب میکروگرم/میلی لیتر و UCP1 تعداد در ۵۰ میکرومتر با روش فولدنج

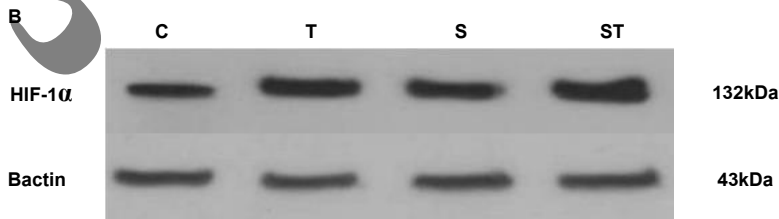
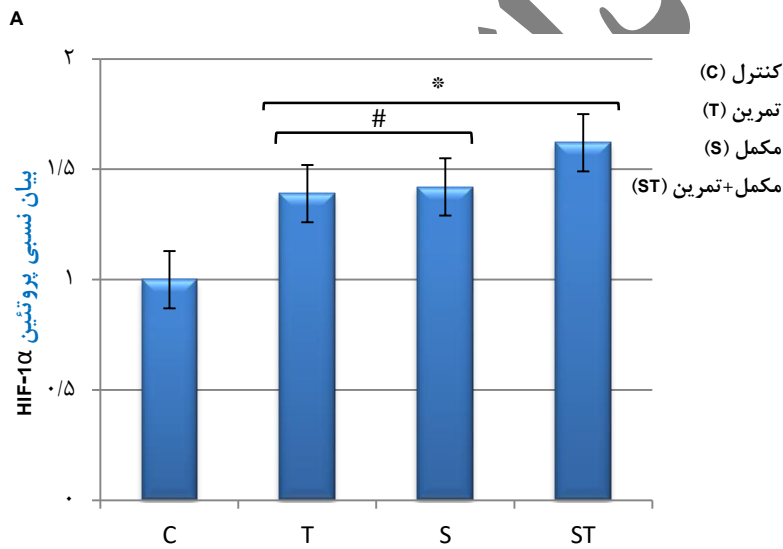


شکل ۱- A) میانگین وزن رت‌ها در دوره چاقی (هر هفته). B) میانگین وزن رت‌ها در دوره تمرین (هر دو هفته یک بار).
* معنی داری گروه‌های T و ST نسبت به گروه C، # معنی داری گروه‌های T و ST نسبت به گروه S

پایان نشده



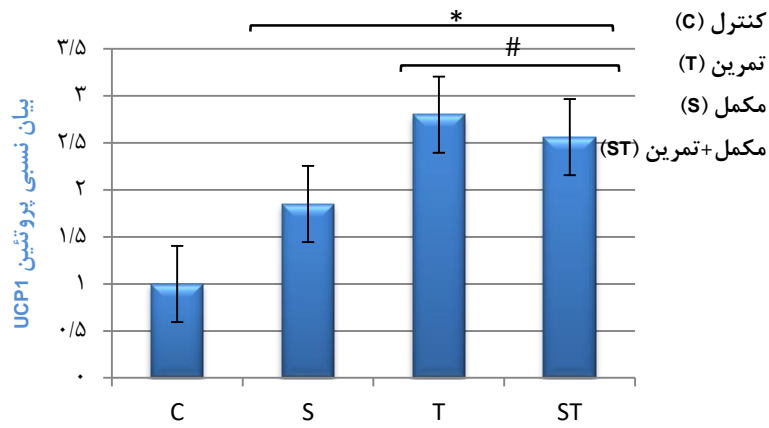
شکل ۲. مقایسه تغییرات بیان ژن miR-۴۵۵ با روش RT-qPCR. * معنی داری نسبت به گروه C، # معنی داری نسبت به گروه S، & معنی داری نسبت به گروه ST. سطح معنی داری $p < 0.05$



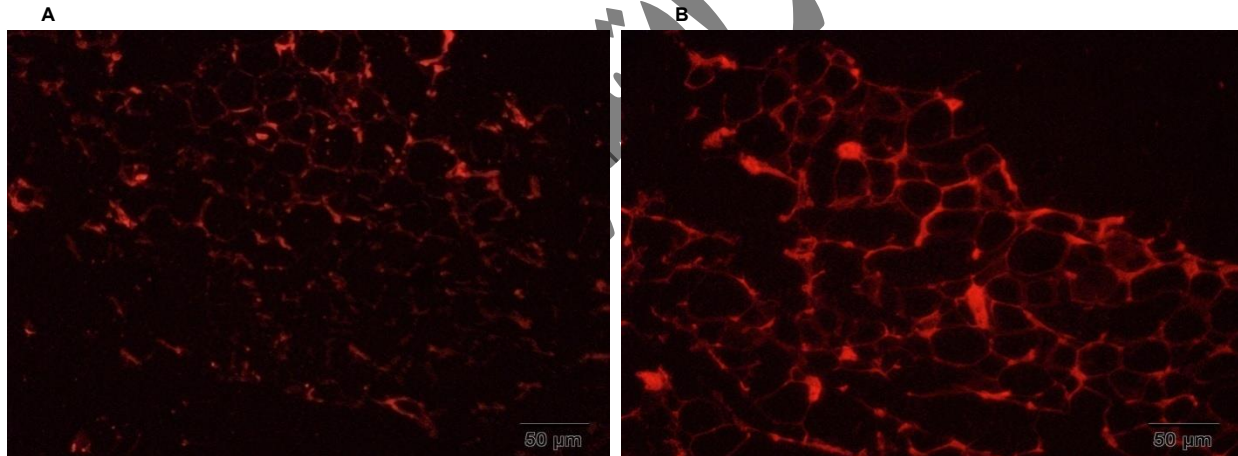
شکل ۳. اثر چاقی، HIIT و تعامل با مکمل بر بیان پروتئین HIF-1α با روش وسترن بلات و مقادیر کمی شده آن (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر). (A) مقادیر کمی شده و مقایسه بیان پروتئین HIF-1α و بتاآکتین به عنوان کنترل داخلی.

(B) تصاویر وسترن بلات HIF-1α و بتاآکتین به عنوان کنترل داخلی. * معنی داری نسبت به گروه C،

معنی داری نسبت به گروه ST، سطح معنی داری $p < 0.05$



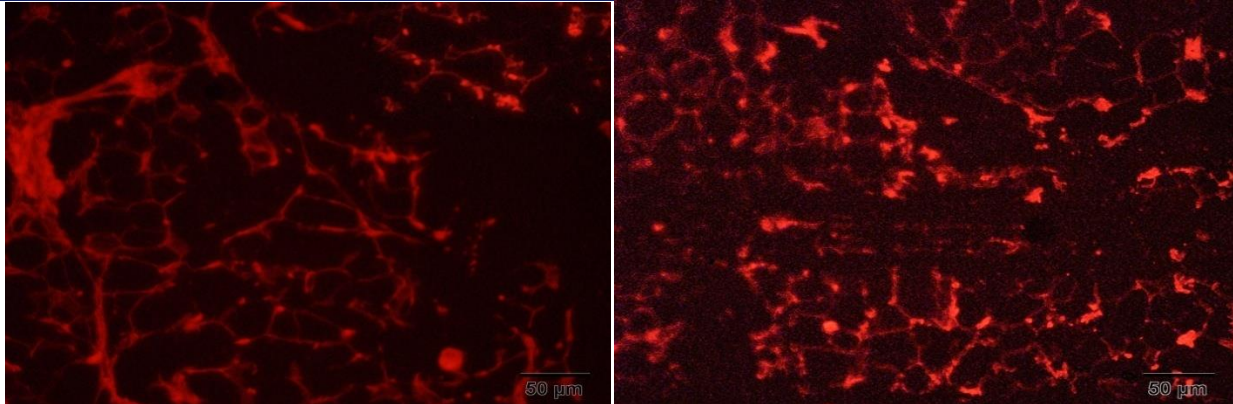
شکل ۴. مقایسه تغییرات بیان پروتئین UCP1 با روش ایمنوفلورانس. * معنی داری نسبت به گروه C، # معنی داری نسبت به گروه S، سطح معنی داری $p < 0.05$



D

E

نشر شده



شکل ۵. تصاویر UCP1 در بافت چربی با روش ایمnofلورانس: (A) گروه کنترل (C)، (B) گروه تمرین (T)، (D) گروه مکمل (S) و (E) گروه مکمل + تمرین (ST)

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که HIIT منجر به کاهش سطح بیان miR-۴۵۵ نسبت به گروه C، S و ST شد. با توجه به محدودیت در پژوهش‌های مرتبط با miR-۴۵۵ و مداخلات ورزشی، به بررسی نقش miR-۴۵۵ با عوامل مرتبط با قهوه‌ای شدن AT پرداخته می‌شود. ژانگ و دیگران (۲۰۱۵) در پژوهشی با عنوان تنظیم چربی‌زایی قهوه‌ای miR-۴۵۵ از طریق فرآیند خود ضمن مهار Necdin و Runx1t1 باعث مهار HIF-1 α شده و منجر به کاهش هیدروکسیلاسیون Asn173 روی پروتئین AMPK-1 α شده در نتیجه آن را فعال می‌کند. این امر از یک طرف منجر به افزایش بیان PGC1 α ، PPAR- γ ، بیوژنز میتوکندری و افزایش تعداد UCP1 شده و از سویی دیگر موجب بیان ژن‌های دخیل در تحرک اسیدهای چرب و لیپولیز می‌شود که مخالف پژوهش حاضر بود. یکی از علل تفاوت، در میزان بیان ژن miR-۴۵۵ عدم استفاده از تمرینات ورزشی در پژوهش آنان بود. همچنین آنها نشان دادند که به طور کلی بیان بیش از حد miR-۴۵۵ در پیش آدیپوسیت‌های قهوه‌ای و سفید باعث تمایز سلولی، افزایش لیپید و بیان ژن‌های چربی‌زایی و قهوه‌ای در بافت چربی زیر پوستی مغبنی شده و ضمن افزایش حداکثر ظرفیت گرمایی موجب بهبود مقاومت به سرما، حساسیت به انسولین، تحمل گلوکز و افزایش کمتر وزن در رژیم غذایی پرچرب و پروفایل لیپیدمیک بهتر می‌شود، علاوه بر این، در رت‌هایی که miR-۴۵۵ مهار شد جرم BAT و بیان UCP1 کاهش یافته، PGC1 α و PPAR- γ در BAT و پروتئین اتصال دهنده تقویت کننده آلفا^۱ در scWAT سرکوب شدند (۵)، همچنین در مطالعه مروری قسمتی^۴ و دیگران (۲۰۲۴) ضمن بررسی انواع میکروریبونوکلیک دخیل در بافت چربی، miR-۴۵۵ را جزء اصلی در بیان هر دو نوع BAT و بژ می‌دانند که در فعال سازی UCP1 نقش مهمی دارند (۲۴). در مطالعه دیگری توسط کای^۵ و دیگران (۲۰۱۶) عنوان شد که UCP1 هدفی برای miR-۴۵۵ در طی تمایز چربی‌زایی در پیش سلول‌های چربی 3T3-L1 است (۲۵). با توجه به نتایج تحقیقات یاد شده و عدم وجود مطالعه با تأثیر تمرینات ورزشی بر روی miR-۴۵۵ و نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد که HIIT باعث کاهش miR-۴۵۵ شد و این موضوع باید منجر به کاهش UCP1 و فعالیت آن شود ولی نتایج ایمnofلورانس نشان از افزایش فعالیت و تعداد UCP1 داشت که این تغییرات حاکی از فعالیت مسیرهای تعاملی دیگری برای افزایش UCP1 می‌باشد. پژوهش‌های گذشته به افزایش فعالیت

1 Subcutaneous white adipose tissue (scWAT)

2 High fat diet (HFD)

3 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α)

4 Ghesmati

5 Cai



مسیرهای مؤثر دیگری همچون میوکین‌های عضله ناشی از تمرینات ورزشی نظیر Irisin (۱۶) و مسیر سیستم عصبی مرکزی و نوراپی‌نفرین^۱ متصل به رسپتورهای بتا آدرنرژیک^۲ سلول‌های چربی اذعان داشته‌اند (۲۶)، بر این اساس در مطالعه حاضر مقادیر بدست آمده از UCP1 حاکی از افزایش معنی‌دار آن نسبت به گروه‌های C و S داشت.

یافته‌های این پژوهش همچنین نشان داد که تجویز ۱۲ هفته کارنیتین باعث افزایش معنی‌دار miR-۴۵۵ نسبت به گروه C، T و ST شد. در پژوهشی همسو اوزاکی و دیگران (۲۰۱۱) به بررسی اثر کارنیتین بر فعال سازی UCP1 پرداخته و بیان کردند که کارنیتین برای قهوه‌ای شدن WAT ضروری است. از طرفی کاهش فعالیت BAT منجر به کاهش حجم میتوکندری و افزایش میزان لیپید درون واکونل‌های سلول چربی می‌شود در نتیجه سطح بیان UCP1 کاهش یافته که با مصرف کارنیتین سطح بیان UCP1-mRNA افزایش می‌یابد. اگر میزان کارنیتین در سلول‌ها کاهش یابد انتقال اسیدهای چرب با زنجیره طولانی برای فرآیند بتااکسیداسیون با اختلال مواجه شده و به میوپاتی و هیپاتومگالی منجر می‌شود که تجویز کارنیتین باعث بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی BAT مانند افزایش حجم میتوکندری و افزایش UCP1 می‌شود (۱۲). همچنین در پژوهش نظری و دیگران (۲۰۱۶؛ ۲۰۲۳) که با هدف افزایش فعالیت چربی سوزی و بررسی تغییرات ۲۷ و miR-۱۴۳ به همراه مکمل ال کارنیتین و هشت هفته غذای پر چرب در رت‌های نر انجام شد، مشخص شد که miR-۲۷ کاهش یافته و miR-۱۴۳ افزایش دارد و در نهایت بیان کردند که چاقی و پاتوژنز ناشی از آن می‌تواند با عوامل غذایی و مکمل ال کارنیتین تعدیل شود (۲۰، ۲۷) که همسو با پژوهش حاضر UCP1 در گروه S نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشت، همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعامل کارنیتین و HIIT در کنار هم موجب افزایش غیرمعنی- دار miR-۴۵۵ در گروه ST نسبت به گروه C شد که ممکن است مصرف ال کارنیتین عاملی برای جلوگیری از کاهش بیشتر miR-۴۵۵ ناشی از تمرین باشد. از طرفی این تعامل باعث افزایش UCP1 نسبت به گروه C و S شد، ولی میانگین پایین‌تری نسبت به گروه T داشت.

در پژوهش حاضر HIF-1 α در گروه‌های T، S و ST نسبت به گروه G افزایش معنی‌داری داشتند. در پژوهشی همسو ساکورای^۳ و دیگران (۲۰۱۰) رت‌های نر چاق را به مدت نه هفته برای تمرین روی نوارگردان قرار دادند در نهایت مشخص شد که HIF-1 α در سلول چربی استرومایی افزایش یافته که تمایز سلول‌های چربی را کاهش می‌دهد (۲۸). در پژوهشی مخالف لی و دیگران (۲۰۲۱) عنوان کردند که رت‌های دریافت کننده غذا با ۶۰٪ چربی و انجام تمرین روی نوارگردان با شدت ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی به مدت ۱۲ هفته ضمن کاهش WAT میزان بیان ژن HIF-1 α نیز کاهش می‌یابد. یکی از علت‌های کاهش HIF-1 α ممکن است شدت پایین تمرین نسبت به پژوهش حاضر باشد. همچنین آنها بیان کردند که با افزایش حجم و تعداد سلول‌های چربی HIF-1 α افزایش می‌یابد تا با التهاب ناشی از چاقی و هیپوکسی به وجود آمده در پی افزایش حجم سلول‌های چربی و کاهش حجم عروق مقابله کند (۱۷). از طرفی در پژوهش ژانگ و دیگران (۲۰۱۵) مشخص شد مهار HIF-1 α توسط miR-۴۵۵ باعث افزایش فعالیت AMPK-1 α و افزایش بیان PGC1 α ، بیوژنز میتوکندری و بیان ژن‌های دخیل در تحرک اسیدهای چرب و لیپولیز می‌شود (۵). در پژوهش پهلوانی^۴ و دیگران (۲۰۱۸)، گزارش گردید که HIF-1 α به عنوان یک هدف میانی بین miR-۴۵۵ و Notch1 عمل می‌کند، با بیان miR-۴۵۵ بیان Notch1 کاهش یافته که به نوبه خود منجر به قهوه‌ای شدن WAT و افزایش UCP1 می‌شود. علاوه بر این، miR-۴۵۵ با کاهش Tgfb β 3 و Smad2/3 (یکی از اعضای مسیر پایین دست)، منجر به افزایش مصرف انرژی و بهبود پروفایل متابولیک شد (۲۹). همچنین افزایش HIF-1 α در گروه‌های S و ST نسبت به گروه C ممکن است ناشی از چاقی یا تغییر فنوتیپ

1 Norepinephrine (NE)

2 β -adrenergic receptors (β -ARs)

3 Sakurai

4 Pahlavani



سلول و افزایش فعالیت UCP1 با مصرف کارنیتین و یا هیپوکسی ناشی از تمرین باشد (۶، ۱۷)، از طرفی افزایش HIF-1 α در گروه ST بیشتر مشهود بود که ممکن است از اثرات تعامل تمرین و کارنیتین باشد.

نتایج پژوهش حاضر و تصاویر بدست آمده از ایمونوفلورانس AT رت‌های گروه S نسبت به گروه C نشان از افزایش تعداد UCP1 داشت، اگر چه تعداد میتوکندری کمتری مشاهده شد و به نظر فعال شدن بیشتر آن نیاز به زمان طولانی‌تری دارد که این موضوع با مصرف انرژی بیشتر توسط UCP1 و افزایش وزن کمتری نسبت به گروه C نمایان شد. پژوهش اوزاکی و دیگران (۲۰۱۱) نشان داد که کارنیتین برای قهوه‌ای شدن AT و فعال سازی UCP1 ضروری است، همچنین با مصرف کارنیتین اسیدهای چرب با زنجیره بلند در دسترس میتوکندری قرار گرفته و از تجمع آن در اندامها جلوگیری بعمل می‌آورد و این موضوع می‌تواند در کاهش وزن نقش داشته باشد (۱۲). همچنین در پژوهش نظری و دیگران (۲۰۱۶؛ ۲۰۲۳) مشخص شد که تغییرات microRNA با پاتونژ ناشی از چاقی ارتباط داشته و رت‌های چاق تغذیه شده با غذای پرچرب و دریافت کننده ال کارنیتین وزن کمتری نسبت به گروه C داشتند (۲۰، ۲۷) که همسو با پژوهش حاضر بود، که علت آن افزایش فعالیت UCP1 بود.

در پژوهش حاضر تصاویر ایمونوفلورانس گروه T نسبت به گروه‌های C و S نشان از افزایش تعداد میتوکندری و فعالیت بیشتر UCP1 داشت که منجر به مصرف انرژی بیشتر و کاهش وزن شد، زیرا نه تنها انجام HIIT موجب افزایش مصرف انرژی در دوره‌های تمرینی و بعد از آن شده (۱۴، ۱۵)، بلکه مصرف انرژی بیشتر در UCP1 نیز عاملی مؤثر برای کنترل و کاهش وزن است (۱۲). نتایج تصاویر ایمونوفلورانس گروه ST نسبت به گروه‌های C و S نشان داد که تعامل کارنیتین در کنار تمرین ضمن افزایش فعالیت BAT، UCP1 بیشتری در حال شکل‌گیری است و می‌تواند باعث افزایش مصرف انرژی در حین تمرین و بعد از آن شود که همسو با آن وزن گروه ST نسبت به گروه‌های C و S نیز کاهش معنی‌دار داشت، اما نسبت به گروه T کاهش غیرمعنی‌داری داشت. در پژوهش ساکورای و دیگران (۲۰۱۰) و خلفی و دیگران (۲۰۲۰) که همسو با پژوهش حاضر بود مشخص شد که فعال شدن UCP1 در کنار مصرف انرژی حاصل از تمرین موجب کاهش و کنترل وزن خواهد شد (۱۵، ۲۸).

نتیجه‌گیری:

مکمل ال کارنیتین باعث افزایش HIF-1 α ، miR-۴۵۵ و UCP1 شد ولی تأثیری بر وزن نداشت. HIIT اثر کاهشی و معکوسی بر miR-۴۵۵ داشت که این موضوع باید منجر به کاهش UCP1 می‌شد، ولی نتایج بدست آمده در این گروه ضمن تأکید بر افزایش فعالیت UCP1 نشان از فعالیت و کنش مسیرهای دیگری بر تبدیل WAT به BAT داشت و در کنار مصرف کالری ناشی از تمرین باعث کاهش وزن شد، همچنین تعامل مکمل ال کارنیتین با HIIT ضمن افزایش miR-۴۵۵ و HIF-1 α باعث فعال سازی UCP1 و افزایش مصرف کالری و کاهش وزن شد، در نتیجه فعال سازی UCP1 و مصرف کالری ناشی از HIIT و تعامل آن با مکمل ال کارنیتین برای مقابله با چاقی مفید بوده و شواهد امیدوارکننده‌ای برای ترویج قهوه‌ای شدن WAT ارائه می‌دهد. اگر چه این اولین پژوهش در بررسی اثر همزمانی HIIT و کارنیتین بر بیان HIF-1 α ، miR-۴۵۵ و UCP1 است و تنظیم BAT توسط عوامل رژیم غذایی و تمرینی تا حد زیادی در سطح مکانیکی و مولکولی ناشناخته باقی مانده است که این امر زمینه تحقیقات بیشتر با انواع پروتکل‌های تمرینی و استفاده از دوزهای متفاوت کارنیتین برای روشن‌تر شدن موضوع است تا فرآیند استفاده از این روش‌ها برای کنترل و یا کاهش وزن در انسان فراهم گردد.

تعارض منافع: هیچ تضادی بین کلیه نویسندگان در منافع این پژوهش وجود ندارد.

قدردانی و تشکر: نویسندگان از آزمایشگاه تحقیقاتی سارا تشکر می‌کنند.

منابع

1. Tchernof A, Després J-P. Pathophysiology of human visceral obesity. *Physiological reviews*. 2013;93(1):359-404. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2011>



2. Gesta S, Kahn CR, JATb. White adipose tissue. In Michael E, editor. Adipose Tissue Biology. Switzerland AG Springer Nature. 2017. p. 149-99. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52031-5_5
3. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*. 2004;84(1):277-359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
4. Gharanei S, Shabir K, Brown JE, Weickert MO, Barber TM, Kyrou I, et al. Regulatory microRNAs in brown, brite and white adipose tissue. *Cells*. 2020;9(11):2489. <https://doi.org/10.3390/cells9112489>
5. Zhang H, Guan M, Townsend KL, Huang TL, An D, Yan X, et al. Micro RNA-455 regulates brown adipogenesis via a novel HIF 1 α -AMPK-PGC1 α signaling network. *EMBO reports*. 2015;16(10):1378-93. <https://doi.org/10.15252/embr.201540837>
6. Marcondes RR, Maliqueo M, Fornes R, Benrick A, Hu M, Ivarsson N, et al. Exercise differentially affects metabolic functions and white adipose tissue in female letrozole- and dihydrotestosterone-induced mouse models of polycystic ovary syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;448:66-76. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.025>
7. Almeida MI, Reis RM, Calin GAJ, MRF, Mutagenesis M Mo. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011;717(1-2):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>
8. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP, Joci. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(2):412-20. <https://doi.org/10.1172/jci3155>
9. Brondani LdA, Assmann TS, Duarte GCK, Gross JL, Canani LH, Crispim DJABdE, et al. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2012;56:215-25. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302012000400001>
10. Knudsen JG, Murholm M, Carey AL, Biensø RS, Basse AL, Allen TL, et al. Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCP1 expression in subcutaneous white adipose tissue. *PloS one*. 2014;9(1):e84910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084910>
11. Bonet ML, Oliver P, Palou AJ, BeBA-M, Lipids CBo. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2013;1831(5):969-985. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.12.002>
12. Ozaki K, Sano T, Tsuji N, Matsuura T, Narama JLi. Carnitine is necessary to maintain the phenotype and function of brown adipose tissue. *nature, Laboratory investigation*. 2011;91(5):704-10. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.6>
13. Yaghoubi Z, Naghibi S, Vatandoust MJ, JoPSoBiS. Comparison of the effect of eight weeks of different aerobic training methods on the expression of angiostatic genes TSP-2 and TGF- β in the subcutaneous adipose tissue of rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport* 2024;12(30):28-40. [In Presian] <https://doi.org/10.22077/jpsbs.2023.5881.1753>
14. Amirsasan R, Khodaei O, Vakili JJ, JoAHSiSP. Effect of High Intensity Interval Training (HIIT) and aerobic continuous training on lipid profile, physiological indicators and aerobic and anaerobic performance in sedentary male. *JAHSSP*. 2017;4(1):28-36. [In Presian]. <https://doi.org/10.22049/jassp.2019.26482.1193>
15. Khalafi M, Mohebbi H, Symonds ME, Karimi P, Akbari A, Tabari E, et al. The impact of moderate-intensity continuous or high-intensity interval training on adipogenesis and browning of subcutaneous adipose tissue in obese male rats. *Nutrients*. 2020;12(4):925. <https://doi.org/10.3390/nu12040925>
16. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-468. <https://doi.org/10.1038/nature10777>



17. Li L, Wei Y, Fang C, Liu S, Zhou F, Zhao G, et al. Exercise retards ongoing adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. *Endocrine connections*. 2021;10(3):325-335. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0643>
18. Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CVJoAP. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *Journal of Applied Physiology*. 1979;47(6):1278-83. <https://doi.org/10.1152/jappl.1979.47.6.1278>
19. Nazari M, Saberi A, Karandish M, Neisi N, Jalali MT, Makvandi MJJoBSP. Influence of L-carnitine on the Expression Level of Adipose Tissue miRNAs Related to Weight Changes in Obese Rats. *PJBS*. 2016;19(5):227-32. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2016.227.232>
20. Tartibian B, Rezaei B, Tayebi MJJoPSoBiS. The effect of HMB-FA supplementation on hormonal responses and recovery of elite wrestlers during the simulated wrestling protocol. *JPSBS*. 2022;10(24):8-21. [In Persian]. <https://doi.org/10.22077/jpsbs.2021.4451.1650>
21. Derin A, Agirdir B, Derin N, Dinc O, Güney K, Ozcaglar H, et al. The effects of l-carnitine on presbycusis in the rat model. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*. 2004;29(3):238-241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2273.2004.00790.x>
22. Hoffmann LS, Etzrodt J, Willkomm L, Sanyal A, Scheja L, Fischer AW, et al. Stimulation of soluble guanylyl cyclase protects against obesity by recruiting brown adipose tissue. *Nature communications*. 2015;6(1):7235. <https://doi.org/10.1038/ncomms8235>
23. Ghesmati Z, Rashid M, Fayezi S, Gieseler F, Alizadeh E, Darabi MJRiE, et al. An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2024;25(2):279-308. <https://doi.org/10.1007/s11154-023-09850-0>
24. Cai Z, Liu J, Bian H, Cai J, Guo XJDP. MiR-455 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through targeting uncoupling protein-1. *Die Pharmazie*. 2016;71(11):625-628. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.015>
25. Collins SJFie. β -adrenoceptor signaling networks in adipocytes for recruiting stored fat and energy expenditure. *Frontiers in endocrinology*. 2012;2:102. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00102>
26. Nazari M, Jalili M, As'habi AJOR, Practice C. Conjugated linoleic acid and L-carnitine combination effects on obesity-related miRNAs in diet-induced obese rats. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2023;17(5):378-82. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2023.08.004>
27. Sakurai T, Endo S, Hatano D, Ogasawara J, Kizaki T, Oh-ishi S, et al. Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. *Acta physiologica*. 2010;200(4):325-338. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02159.x>
28. Pahlavani M, Wijayatunga NN, Kalupahana NS, Ramalingam L, Gunaratne PH, Coarfa C, et al. Transcriptomic and microRNA analyses of gene networks regulated by eicosapentaenoic acid in brown adipose tissue of diet-induced obese mice. *(BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2018;1863(12):1523-1531. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.09.004>