

## تأثیر همزمانی دوازده هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) و مکمل دهی ال کارنیتین بر بیان ژن $mir-155$ ، $C/EBP\beta$ و $PGC-1\alpha$ در بافت چربی سفید رت‌های نر چاق

وحید ساری صراف<sup>۱</sup>، مصطفی خانی<sup>۲</sup>، مهدی ساقی<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول: استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، پست الکترونیکی: sarraf@tabrizu.ac.ir

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۳۰

### چکیده

**سابقه و هدف:** تمرینات ورزشی و کارنیتین باعث افزایش فعالیت میتوکندریایی بافت چربی می‌شود. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر همزمانی HIIT و مکمل دهی ال کارنیتین بر بیان  $mir-155$ ،  $C/EBP\beta$  و  $PGC-1\alpha$  در بافت چربی زیرپوستی بود.

**مواد و روش‌ها:** ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار با دامنه سنی ۶ هفته پس از ۸ هفته القاء چاقی به طور تصادفی به چهار گروه: کنترل (C)، تمرین (T)، ال کارنیتین (L) و تمرین-ال کارنیتین (TL) تقسیم شدند. گاوژ با ال کارنیتین روزانه  $30\text{ mg/kg}$  وزن بدن و پروتکل HIIT ۸۵-۹۰ درصد سرعت بیشینه روی نوارگردان، ۵ روز در هفته به مدت ۱۲ هفته اجرا شد. بیان ژن  $mir-155$  با روش qReal-TimePCR و  $C/EBP\beta$  و  $PGC-1\alpha$  با وسترن بلات اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس دو طرفه در سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  انجام شد.

**یافته‌ها:** بیان ژن  $mir-155$  در گروه L نسبت به گروه‌های T و C کاهش معنی‌دار داشت ( $p < 0.001$ ). همچنین بیان  $C/EBP\beta$  و  $PGC-1\alpha$  در همه گروه‌های L، T و TL نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). اثر همزمانی تمرین و ال کارنیتین بر بیان  $mir-155$  و  $PGC-1\alpha$  معنی‌دار نشد ( $p > 0.05$ )؛ ولی بر بیان  $C/EBP\beta$  معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). وزن گروه‌های T و TL نسبت به گروه C و L کاهش معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** همزمانی HIIT و ال کارنیتین تأثیر معنی‌داری بر افزایش عوامل بالا دستی قهوه‌ای شدن بافت چربی نداشت، از طرفی ال کارنیتین با کاهش  $mir-155$  و HIIT با عدم تغییر  $mir-155$  بیوژنز میتوکندری را افزایش دادند. در این بین، کاهش وزن ناشی از تمرین رخ داد. پژوهش‌های بیشتری در این زمینه لازم می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** ال کارنیتین، تمرین تناوبی با شدت بالا،  $mir-155$ ،  $C/EBP\beta$  و  $PGC-1\alpha$

### پیام‌های اصلی

- کاهش فعالیت بدنی و تغذیه با غذای پرکالری عامل چاقی است.
- چاقی با افزایش  $mir-155$  و کاهش فعالیت  $C/EBP\beta$  منجر به کاهش فعالیت عوامل اصلی بالا دستی قهوه‌ای شدن بافت چربی مانند  $PGC-1\alpha$  می‌شود.
- ال کارنیتین با کاهش  $mir-155$  و HIIT با عدم تغییر  $mir-155$  منجر به افزایش  $C/EBP\beta$  و  $PGC-1\alpha$  عامل اصلی قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید شدند.
- همزمانی ال کارنیتین و HIIT تأثیری بر عوامل قهوه‌ای شدن بافت چربی نداشت.
- مصرف کالری ناشی از تمرین و همزمانی آن با ال کارنیتین منجر به کاهش وزن شد.

## ● مقدمه

دیابت و سایر موارد مرتبط با بیماری‌های متابولیک مورد توجه تحقیقات زیادی قرار گرفته است (۱۷-۱۵، ۶)، همچنین تغذیه و مواد غذایی مختلفی مانند ال کارنیتین در قهوه‌ای شدن WAT و افزایش فعالیت میتوکندری BAT نقش دارند. ال کارنیتین علاوه بر کاهش تولید لاکتات و اثرات آنتی اکسیدانی، نقش اساسی در انتقال اسیدهای چرب با زنجیره طولانی به میتوکندری‌ها برای فرآیند بتاکسیداسیون دارد، با کاهش کارنیتین، اسیدهای چرب با زنجیره طولانی برای بتاکسیداسیون در دسترس نبوده و باعث تجمع بیش از حد چربی در عضله اسکلتی، قلب، کبد و در نهایت منجر به میوپاتی و هپاتومگالی می‌شود (۱۸). علاوه بر این در موش‌های استئاتوز احشایی لرزش‌های مداومی مشاهده می‌شود که دلیل آن کاهش تولید گرما و افزایش حساسیت به سرما است. در این موش‌ها مورفولوژی BAT شبیه WAT بوده و حاوی چربی زیاد است (۱۹). این موارد باعث کاهش بیان میتوکندری و UCP-1 شده و درمان با کارنیتین منجر به افزایش قابل توجهی در دمای بدن و غلظت کارنیتین در BAT همراه با بهبود مورفولوژی طبیعی شده و سطح miRNA و بیان UCP-1 نیز به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱۸).

امروزه تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) با افزایش مصرف کالری در حین تمرین و بعد از آن (۲۰، ۸) جهت درمان چاقی و کاهش وزن به عنوان روش درمان غیردارویی چاقی مورد توجه محققان قرار گرفته است. اغلب پژوهش‌ها اثر استرس سرمایی (۲۱)، ال کارنیتین (۱۸)، تمرینات هوازی (۲۲) و HIIT (۲۰) را بر تغییرات WAT به BAT بررسی کرده‌اند که بدون اندازه‌گیری miRNA سلول چربی بود. در زمینه فعال سازی و مهار miR-۱۵۵ و عوامل مرتبط با آن پژوهش‌های کمی وجود دارد که بدون پروتکل ورزشی می‌باشد (۱۵)، همچنین تاکنون در رابطه با تاثیر تعاملی و همزمانی HIIT و ال کارنیتین در سلول بافت چربی و میزان بیان miR-۱۵۵، C/EBP $\beta$  و PGC-1 $\alpha$  پژوهشی تا زمان نگارش این مجموعه در موتورهای جستجوگر فارسی و انگلیسی یافت نشده و نقش این تنظیم کننده‌ها پس از تجویز HIIT و ال کارنیتین در سلول‌های بافت چربی مشخص نیست.

## ● مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-آزمایشگاهی است که بر روی مدل حیوانی شامل ۳۶ سر رت نر ویستار سالم (۶ هفته، محدوده

چاقی یک تهدید فزاینده برای سلامتی است. از عوامل ایجاد چاقی و اختلالات متابولیکی شیوه زندگی مدرن و کاهش فعالیت بدنی است. بافت چربی طبیعی و میزان مناسب آن منجر به کاهش عوارض چاقی از جمله مقاومت به انسولین (۳-۱)، کبد چرب غیرالکلی و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شود (۴). از عوامل چاقی می‌توان به کاهش فعالیت میتوکندریایی بافت چربی ناشی از تغییر فعالیت برخی عوامل تنظیمی بالا دستی نظیر میکروریبونوکلئیک‌ها (miRNA) (۶، ۵) و یا کاهش فعالیت گیرنده گاما فعال شده با تکثیر کننده پراکسی زوم آلفا-۱ (PGC-1 $\alpha$ ) (۷) و گیرنده فعال شده با تکثیر کننده پراکسی-زوم گاما (PPAR- $\gamma$ ) (۸) اشاره کرد، از طرفی تعادل بین بافتهای چربی از مهمترین عوامل مؤثر در هموستاز دمای بدن، انرژی و کنترل وزن است (۹) که شامل بافت چربی سفید (WAT)، قهوه‌ای (BAT) و بژ (Beige) است (۱۰، ۲). گرمایی با واسطه BAT و Beige با افزایش بیان ژن پروتئین‌های درگیر در لیپولیز و گرمایی که با میزان بالای انتقال اسیدهای چرب و اکسیداسیون در پروتئین جفت نشده-۱ (UCP-1) مشخص می‌شود (۸). عوامل تغذیه‌ای (۱۱)، دارویی (۱۲)، محیطی (۱۳) و تمرینات ورزشی (۱۴) به عنوان محرک بیان UCP-1 در WAT بیان شده‌اند، همچنین نقش PGC-1 $\alpha$  (۷)، PPAR- $\gamma$  (۸) و برخی miRNA (۶، ۵) در این فرآیند مشخص شده است. miRNA گروهی از RNAهای رمزگذار کوتاه را تشکیل می‌دهند که با هدف قرار دادن RNA پیام‌رسان، القاء یا تخریب RNA پیام‌رسان و بیان ژن را تنظیم می‌کنند (۶). در این بین، میکروریبونوکلئیک-۱۵۵ (miR-۱۵۵) یک تنظیم کننده منفی BAT است که به شدت در تکثیر پیش چربی قهوه‌ای بیان و با تمایز سلولی کاهش می‌یابد، از طرفی پروتئین اتصال دهنده و تقویت کننده (C/EBP $\beta$ ) برای تمایز چربی قهوه‌ای و بژ بسیار مهم است (۱۷-۱۵). miR-۱۵۵ توسط C/EBP $\beta$  به طور منفی تنظیم شده و یک حلقه بازخورد مضاعف ایجاد (۱۵) و می‌تواند بر PGC-1 $\alpha$  که یک تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندری و فعال کننده اصلی PPAR- $\gamma$  است؛ تأثیر بگذارد. به طوری که افزایش بیان miR-۱۵۵ باعث کاهش PGC-1 $\alpha$  و UCP-1 شده و غیرفعال سازی آن به طور قابل توجهی بیان برنامه‌های ترموژنیک را افزایش می‌دهد (۱۵).

بیان اثرات miRNA در انواع گوناگون بافت چربی با هدف گسترش روش‌های جدید مبتنی بر miRNA در برابر چاقی،

شدند، که به صورت آزادانه با غذای استاندارد (۱۰٪ چربی، ۷۰٪ کربوهیدرات و ۲۰٪ پروتئین) تغذیه شدند (جدول ۲). میزان غذای مصرفی با وزن کشتی، ثبت و کنترل گردید. جهت تهیه غذای پرچرب پلت‌ها، خرد شده سپس روزانه با چربی دنبه مخلوط و مجدد به پلت تبدیل شد. مقدار چربی موجود در پلت با روش سوکسله مورد سنجش قرار گرفت. خوراک استاندارد جوندگان از شرکت به‌پرور تهیه شد.

**معیارهای ورود و خروج از پژوهش:** از معیارهای حضور در پژوهش می‌توان به سلامتی کامل از لحاظ ظاهری و آناتومیکی، عدم استفاده در پژوهش‌های گذشته، نر بودن رت‌ها، سن ۶ هفته‌ای، توانایی دویدن با سرعت حداقل ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه روی نوارگردان و وزن تقریبی حدود ۱۸۰ گرم اشاره کرد، همچنین مؤنث بودن، مرگ در حین دوره پژوهش، آسیب یا عدم توانایی اجرای کامل برنامه تمرینی و عدم تحمل گاوژ به دلیل ساختار آناتومیک نابهنجار معیارهای خروج از پژوهش بودند.

وزن  $180 \pm 20$  گرم) و با رعایت موارد اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و با اخذ کد اخلاق از کمیته اخلاق زیست- پزشکی دانشگاه تبریز (IR.TABRIZU.REC.1401.042) انجام شد. همه رت‌ها در شرایط یکسان و مطلوب حیوانات آزمایشگاهی (چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲، دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $50 \pm 3$  درصد) و یک هفته سازگاری با شرایط محیطی آزمایشگاه به جهت جلوگیری از استرس و آغاز چرخه شبانه روزی (دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد) قرار گرفتند.

**القاء چاقی:** یک هفته پس از آشنایی رت‌ها با محیط آزمایشگاه و در سن ۷ هفتهگی رژیم غذای پرچرب (۶۰٪ چربی، ۲۰٪ کربوهیدرات و ۲۰٪ پروتئین) (۸) به مدت ۸ هفته استفاده شد که در نهایت، محدوده وزن رت‌ها به حدود  $420 \pm 30$  گرم رسید. پس از القاء چاقی (اندازه‌گیری چاقی با شاخص BMI = تقسیم وزن بدن به گرم بر مربع طول بدن از بینی تا مقعد به سانتی‌متر مربع) (جدول ۱)، رت‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم

جدول ۱. مشخصات آنتروپومتریکی رت‌ها در ابتدا و بعد از القاء چاقی

وضعیت	گروه	وزن (گرم)	قد (سانتیمتر)	شاخص توده بدنی (وزن به گرم تقسیم بر مجذور قد به سانتیمتر) گرم بر سانتیمتر مربع
ابتدای پژوهش	کنترل (C)	$218/97 \pm 13/18$	$19/05 \pm 0/68$	$0/60 \pm 0/06$
	ال کارنیتین (L)	$220/03 \pm 6/46$	$19/07 \pm 0/72$	$0/60 \pm 0/05$
	تمرین (T)	$221/60 \pm 16/47$	$18/78 \pm 0/61$	$0/62 \pm 0/06$
	ال کارنیتین و تمرین (TL)	$224/27 \pm 6/51$	$18/97 \pm 0/70$	$0/62 \pm 0/05$
بعد از ۸ هفته القاء چاقی	کنترل (C)	$450/77 \pm 10/50$	$23/05 \pm 0/45$	$0/84 \pm 0/03$
	ال کارنیتین (L)	$451/99 \pm 9/04$	$22/88 \pm 0/38$	$0/86 \pm 0/02$
	تمرین (T)	$453/75 \pm 8/80$	$23/06 \pm 0/43$	$0/85 \pm 0/03$
	ال کارنیتین و تمرین (TL)	$450/90 \pm 10/73$	$22/95 \pm 0/39$	$0/85 \pm 0/03$

جدول ۲. مشخصات گروه‌ها و تغییرات وزن در پیش آزمون و پس آزمون

مشخصات گروه	واژه	انحراف معیار ± میانگین پیش از آزمون	انحراف معیار ± میانگین پس از آزمون
کنترل (چاق و بدون تمرین)	C	$450/77 \pm 10/50$	$466/77 \pm 9/15$
ال کارنیتین (چاق و بدون تمرین با مکمل)	L	$451/99 \pm 9/04$	$462/57 \pm 9/35$
تمرین (چاق با تمرین تناوبی با شدت بالا)	T	$453/75 \pm 8/80$	$448/83 \pm 10/61$
ال کارنیتین و تمرین (چاق با مکمل و تمرین تناوبی با شدت بالا)	TL	$450/90 \pm 10/73$	$442/57 \pm 10/31$

**استخراج نمونه بافت و سنجش متغیرهای وابسته:** miR-۱۵۵ با استفاده از qReal-TimePCR: کلیه رت‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و یک شب ناشتایی، با استفاده از کتامین (۶۰ mg/kg) و زایزالین (۶ mg/kg) بیهوش شده و بدون درد با گیوتین قربانی شدند. نمونه بافت چربی زیر پوستی ناحیه ران (۲۱) برداشته، بلافاصله به میکروتیوب منتقل و در داخل تانک حاوی نیتروژن مایع قرار داده شدند و برای ادامه مراحل آنالیز بیوشیمیایی به فریزر دمای  $-۸۰^{\circ}\text{C}$  انتقال یافتند. حدود ۱۰۰ mg از بافت چربی با اضافه کردن محلول تریزول (Trizol، آلمان) و با استفاده از گراندیندر هموژنیزه و در دوره‌های متفاوت با سانتریفوژ یخچال دار (زیگما، آمریکا) سانتریفوژ شد. بعد از اضافه کردن Depc water با استفاده از Dry Bath رسوب و RNAها در دمای  $۶۰^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد تا در آب حل شوند. بعد از انجام Spin غلظت نمونه با استفاده از دستگاه Nano Drop (USA, Thermo) در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. برای تهیه اولین رشته از cDNA از روی RNAهای کل استخراج شده به کمک پرایمر اختصاصی ژن‌ها و بر اساس آنزیم ترانسکریپتاز معکوس تهیه شده بود، انجام شد. بعد از مشخص شدن غلظت و خلوص RNAهای استخراج شده و حصول اطمینان از عدم وجود آلودگی فنولی، اقدام به سنتز cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت (TAKARA, ژاپن) شد. در نهایت برای کمی سازی بیان ژن از فرمول  $C=۲^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده شد. پرایمر ژن miR-۱۵۵ (ژن هدف) و u6 (ژن مرجع) به عنوان کنترل داخلی (Light, Light, oligo7 انجام شد (جدول ۴). واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. پارامترهای واکنش انکوباسیون طبق دستورالعمل سازنده کیت در دمای  $۹۵^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه  $۹۵^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه و  $۶۰^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه بود.

**آماده سازی و پروتکل تمرینی:** برای یک هفته (۵ روز تمرین، یک روز استراحت و یک روز آزمون) جهت آشنایی رت‌ها (گروه‌های T و TL) با نحوه دویدن بر روی نوارگردان جوندگان (۵ کانال، ژنیران) بدون شیب و سرعت ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. گروه‌های C و L برای ایجاد شرایط برابر و سازگاری با محیط ۵ روز در هفته به مدت ۱۵ دقیقه بر روی نوارگردان بدون حرکت قرار می‌گرفتند. در پایان هفته‌ی آشنا سازی، جهت تعیین سرعت دویدن از آزمون استاندارد بدفورد (Bedford) استفاده شد (۲۳). این آزمون شامل ۱۰ مرحله ۳ دقیقه‌ای بود. که در آن رت‌ها باید با سرعت معادل ۰/۳ کیلومتر در ساعت و با افزایش ۰/۳ کیلومتر در ساعت (معادل ۵ متر بر دقیقه) با شیب ۲۵ درجه تا رسیدن به واماندگی طی می‌کردند. زمان رسیدن به واماندگی با ایجاد شوک مکرر یا امتناع رت از دویدن مشخص شد. از گروه‌های T و TL در هر دو هفته یکبار آزمون تعیین سرعت دویدن در یک روز غیر تمرین گرفته می‌شد تا شدت تمرینات برای جلسات بعدی مشخص گردد، این امر از شدت نسبی یکسان در طول جلسات تمرین جلوگیری کرده و برای کسب نتایج مطلوب ضروری است (۲۴).

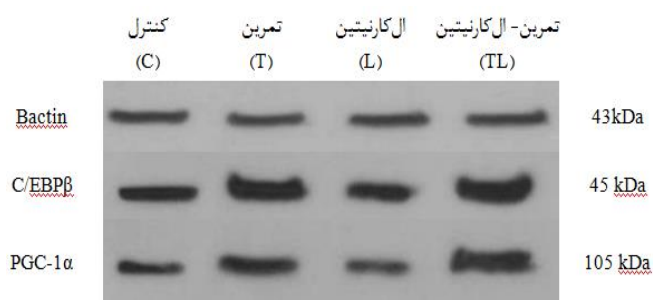
**روش تمرین:** HIIT ۵ روز در هفته به مدت ۱۲ هفته انجام شد که شامل: ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن با دویدن بر روی نوارگردان با شدت کمتر از ۶۰٪ سرعت بیشینه، ۱۰ وهله ۴ دقیقه‌ای ۸۵-۹۰٪ سرعت بیشینه با استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای بین هر وهله معادل ۵۰-۶۰٪ سرعت بیشینه تعیین شده بر روی نوارگردان بدون شیب بود (جدول ۳) (۸).

**روش مصرف ال کارنیتین:** ۳۰ mg/kg وزن بدن در شبانه روز ال کارنیتین (So.Se PHARM) ایتالیا به روش گاواژ (۲۵) به مدت سه ماه که جهت جذب بهتر یک ساعت بعد از تمرین بین ساعت ۱۷-۱۹ در گروه‌های L و TL استفاده شد (۲۶). برای گروه‌های C و T محلول آب مقطر ۳۰ mg/kg وزن بدن (۲۷) داده شد.

جدول ۳. برنامه اجرایی HIIT

هفته	جلسه	۵ دقیقه گرم کردن یا سرد کردن با شدت	برنامه اصلی تمرین (دقیقه × وهله (تکرار) ۱×۴)	استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای با شدت	شیب	سرعت (متر بر دقیقه)
۲-۱	۱-۱۰	کمتر از ۶۰٪ سرعت بیشینه	۸۵-۹۰٪ سرعت بیشینه	۵۰-۶۰٪ سرعت بیشینه	صاف	۱۲
۴-۳	۱۱-۲۰					۱۵
۶-۵	۲۱-۳۰					۱۷
۸-۷	۳۱-۴۰					۲۰
۱۰-۹	۴۱-۵۰					۲۴
۱۲-۱۱	۵۱-۶۰					۲۶

آزمون تعیین سرعت دویدن در ابتدای پژوهش و پایان هفته‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ در یک روز غیر تمرین گرفته شد تا ضمن تعیین شدت تمرینات برای جلسات بعدی، از انجام شدت نسبی یکسان در طول جلسات جلوگیری شود.



شکل ۱. نتایج بدست آمده با روش وسترن بلات برای C/EBPβ و PGC-1α در چهار گروه پژوهش نسبت به Bactin

**روش‌های آماری:** برای توصیف داده‌ها از میانگین و انحراف استاندارد استفاده شد (جدول ۵). طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروولیک مورد سنجش قرار گرفت. جهت بررسی تفاوت بین گروه‌ها آزمون آنالیز واریانس دواره (جدول ۶) و برای تعیین جایگاه معنی‌داری از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. کلیه روش‌های آماری با نرم‌افزار SPSS<sup>۲۶</sup> در سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  انجام شد.

#### • یافته‌ها

نتایج نشان داد که اثر ال کارنیتین بر بیان ژن miR-155 معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) ولی اثر تمرین و همزمانی تمرین-ال کارنیتین معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) (جدول ۵)، نتایج بررسی بین گروهی حاصل از آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که بیان ژن miR-155 در گروه L نسبت به گروه‌های C و T ( $p = 0.001$ ) کاهش معنی‌داری داشت، اما گروه L نسبت به گروه TL ( $p = 0.21$ ) اختلاف معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ). همچنین بین گروه‌های C و T اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ) (نمودار ۱).

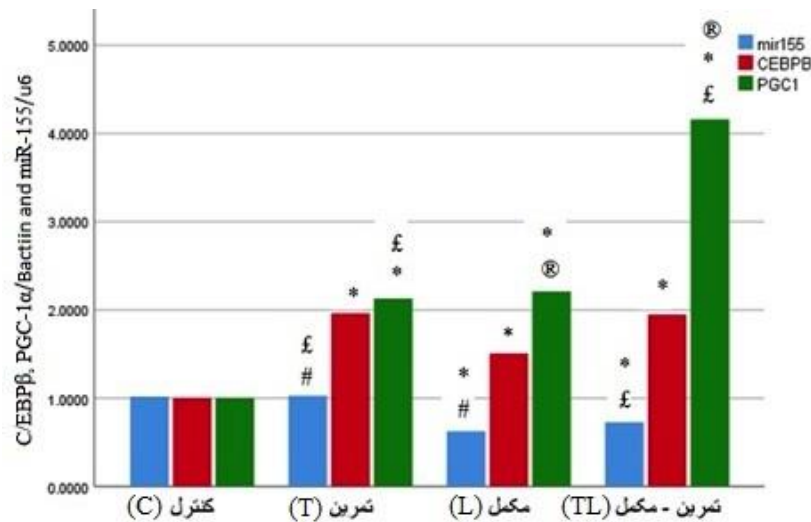
جدول ۴. توالی پرایمر ژن هدف (miR-155) و ژن مرجع (U6)

ژن	توالی پرایمر
miR-155	For: UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU Rev: CCAGTGC AGGGTCCGAGGTA
U6	For: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT Rev: CGCTCACGAATTTGCGTGCAT

**بیان پروتئین C/EBPβ و PGC-1α با استفاده از روش وسترن بلات:** به طور خلاصه با استخراج پروتئین و تعیین غلظت به روش بردفرد در طول موج ۶۳۰ نانومتر و تهیه غلظت‌های مختلف BSA برای کشیدن منحنی استاندارد، تفکیک پروتئین با الکتروفورز در ژل آکرلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS)، Blocking و جلوگیری از واکنش غیر اختصاصی آنتی بادی اولیه با محلول ۲٪ شیر خشک بدون چربی در بافر TBS-T، پس از اتمام انتقال پروتئین‌ها بر سطح کاغذ PVDF، مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه β-actin (sc-) آنتی‌بادی‌های Anti-PGC1 و C/EBPβ(H-7):Sc-7962:1:200 به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت و جایگزینی آن با آنتی‌بادی alpha antibody ab54481:1:1000 و انکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه Anti Rabbit با غلظت (1:1000) انجام شد. در مرحله آشکارسازی که فیلم رادیوگرافی با ورقه نازک نایلونی پوشانده شده و در معرض نور لومینسانس ساطع شده از غشاء قرار گرفت و چگالی باندها با نرم‌افزار دانسیومتری (Image J, Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲ تعیین شد (شکل ۱).

جدول ۵. متغیرهای مورد مطالعه در گروه‌های مختلف (انحراف معیار ± میانگین) (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

متغیرها	miR-155	C/EBPβ	PGC-1α
بدون ال کارنیتین (T)	۱/۰۲±۰/۰۹	۱/۹۶±۰/۳۶	۲/۱۲±۰/۴۱
با ال کارنیتین (TL)	۰/۷۲±۰/۱۲	۱/۹۴±۰/۳۴	۴/۱۵±۱/۱۴
مجموع	۰/۸۷±۰/۱۸	۱/۹۵±۰/۳۴	۳/۱۴±۱/۳۴
بدون ال کارنیتین (C)	۱/۰۱±۰/۱۱	۱/۰۰±۰/۰۰	۱/۰۰±۰/۰۰
با ال کارنیتین (L)	۰/۶۲±۰/۰۴	۱/۵۰±۰/۴۸	۲/۲۰±۰/۸۲
مجموع	۰/۸۲±۰/۲۱	۱/۲۵±۰/۴۲	۱/۶۰±۰/۸۴
بدون ال کارنیتین	۱/۰۱±۰/۱۰	۱/۴۸±۰/۵۵	۱/۵۶±۰/۶۴
مجموع	۰/۶۷±۰/۱۰	۱/۷۲±۰/۴۶	۳/۱۸±۱/۳۹
مجموع	۰/۸۴±۰/۲۰	۱/۶۰±۰/۵۲	۲/۳۷±۱/۳۵



نمودار ۱. تغییرات میانگین بیان ژن miR-۱۵۵ و بیان C/EBPβ و PGC-1α در گروه‌های مورد مطالعه، \* معنی‌داری نسبت به C، # معنی‌داری نسبت به T، £ معنی‌داری نسبت به L، ® معنی‌داری نسبت به TL

اثر همزمانی تمرین-ال کارنیتین و اثر ال کارنیتین بر وزن معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ )، اما اثر تمرین بر وزن معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). از طرفی بین وزن گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.05$ )، که وزن گروه T ( $p = 0.020$ ) و TL ( $p = 0.001$ ) نسبت به گروه L و وزن گروه T ( $p = 0.003$ ) و TL ( $p = 0.001$ ) نسبت به گروه C کاهش معنی‌داری داشتند، اما گروه L ( $p = 1/0.00$ ) نسبت به گروه C و گروه TL ( $p = 1/0.00$ ) نسبت به گروه T تغییرات معنی‌داری نداشتند، اگر چه نتایج نشان از وزن کمتر گروه L نسبت به گروه C و گروه TL نسبت به گروه T داشت.

اثر همزمانی تمرین-ال کارنیتین، اثر تمرین و اثر ال کارنیتین بر بیان C/EBPβ معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) (جدول ۶)، از طرفی گروه‌های T ( $p = 0.001$ )، L ( $p = 0.02$ ) و TL ( $p = 0.001$ ) نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشتند، اما گروه T نسبت به L ( $p = 0.06$ ) و گروه‌های T ( $p = 1/0.00$ ) و L ( $p = 0.071$ ) نسبت به TL اختلاف معنی‌داری نداشتند (نمودار ۱).  
اثرات ال کارنیتین و تمرین به تنهایی بر بیان PGC-1α معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) ولی اثر همزمانی تمرین-ال کارنیتین بر بیان PGC-1α معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) (جدول ۶). گروه‌های T ( $p = 0.001$ )، L ( $p = 0.009$ ) و TL ( $p = 0.001$ ) نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشتند، اما تفاوت بین گروه T نسبت به گروه L معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) (نمودار ۱).

جدول ۶. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو راهه جهت بررسی تغییرات متغیرها

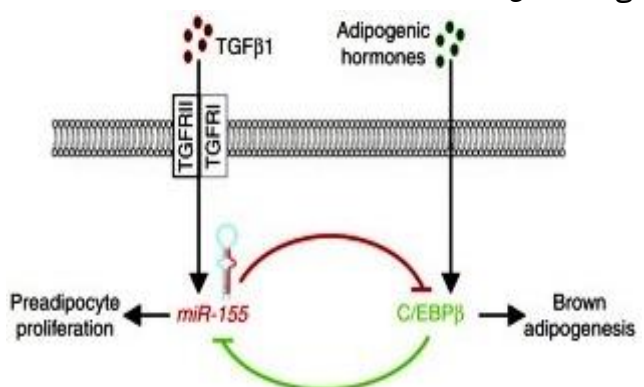
متغیرها	گروه‌ها	مجموع مجذورات	F	سطح معنی‌داری	اندازه اثر
miR-۱۵۵	ال کارنیتین	۱/۰۷	۱۱۱/۲۲	* ۰/۰۰۱	۰/۷۷
	تمرین	۰/۰۲	۲/۸۰	۰/۱۰۴	۰/۰۸
	تمرین- ال کارنیتین	۰/۰۱	۲/۰۱	۰/۱۶	۰/۰۵
C/EBPβ	ال کارنیتین	۰/۵۳	۴/۳۲	* ۰/۰۴	۰/۱۱
	تمرین	۴/۴۲	۳۵/۹۸	* ۰/۰۰۱	۰/۵۲
	تمرین- ال کارنیتین	۰/۶۰	۴/۹۴	* ۰/۰۳	۰/۱۳
PGC-1α	ال کارنیتین	۲۳/۶۲	۴۳/۳۸	* ۰/۰۰۱	۰/۵۷۶
	تمرین	۲۱/۳۰	۳۹/۱۴	* ۰/۰۰۱	۰/۵۵۰
	تمرین- ال کارنیتین	۱/۵۲	۲/۸۰۵	۰/۱۰۴	۰/۰۸۱
وزن	ال کارنیتین	۲۰۱/۴۰	۲/۰۶	۰/۱۶	۰/۰۶۱
	تمرین	۳۴۱۱/۹۲	۳۴/۹۵	* ۰/۰۰۱	۰/۵۲۲
	تمرین- ال کارنیتین	۲۰/۹۹	۰/۲۱	۰/۶۴	۰/۰۰۷

\* معنی‌داری در سطح  $p < 0.05$

## • بحث

C/EBP $\beta$  برای تمایز سلول‌های چربی قهوه‌ای و بژ بسیار مهم است و کاهش C/EBP $\beta$  منجر به نقص BAT می‌شود، زیرا وقتی که موش‌های فاقد C/EBP $\beta$  در سرما قرار گرفتند، دمای بدن را حفظ نکردند که با عدم تغییر UCP-1 و PGC-1 $\alpha$  و با کاهش ظرفیت تامین اسید چرب به عنوان سوخت برای حفظ گرمایی چربی قهوه‌ای همراه بود (۱۶). همچنین گزارش شده که رت‌های با کاهش miR-155 نرخ تنفس سلولی بالا و افزایش تعداد سلول‌های چربی قهوه‌ای مانند در WAT مغربی را پس از قرار گرفتن در سرما نشان دادند (۱۵). حذف miR-155 می‌تواند گرمایی و حساسیت به انسولین را افزایش داده در حالی که با محدود کردن التهاب در WAT باعث جلوگیری از چاقی ناشی از رژیم غذایی در رت‌ها می‌شود (۲۸). در واقع رت‌های ترا ریخته که miR-155 بیش از حد بیان می‌کنند، کاهش جرم BAT، تغییر مورفولوژی BAT و سطوح پایین‌تر از BAT را بدون نشانگرهای ترموژنیک تغییر در وزن بدن و دریافت غذا نشان می‌دهند (۱۵). در پژوهش Karkeni و همکاران (۲۰۱۶) بافت چربی موش‌های نر چاق و لاغر مدل C57BL/6J با افزایش P65 مقایسه شدند. حیوانات با چربی غنی شده خوک به میزان ۵۸٪ درصد کالری مصرفی به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه با TNF $\alpha$  در زمانهای ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با دوزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر انکوبه شدند. قوی‌ترین عامل القاء شده در سلول چربی با حضور TNF $\alpha$  از مجموع نه miRNA مورد بررسی، تنها miR-155 بود که با افزایش حالت التهابی همراه بوده و نشان دادند که miR-155 در بافت غنی از چربی بیشتر از بافت چربی گروه کنترل سالم است (۳). همچنین قرار گرفتن در دمای محیطی ۴°C به مدت ۴ ساعت برای ۱۰ تا ۱۲ هفته باعث می‌شود که miR-155 به عنوان یک تنظیم کننده اصلی منفی در تولید چربی قهوه‌ای، بژ و تولید گرما کاهش یابد که نتیجه آن نرخ تنفس سلولی بالا و افزایش تعداد سلول‌های چربی قهوه‌ای در WAT ناحیه ران است. miR-155 با مهار بیان UCP-1، Cidea، PPAR- $\gamma$  از قهوه‌ای شدن WAT جلوگیری می‌کند (۱۵). همچنین رت‌های فاقد miR-155 تغذیه شده با HFD در مقایسه با نوع وحشی، ۵۶ درصد وزن کمتری اضافه کردند (۲۸). بر اساس تحقیقات گذشته به نظر می‌رسد که حذف یا کاهش miR-155 عاملی برای فعال سازی بافت چربی قهوه‌ای و بژ است که همسو با آن در پژوهش حاضر miR-155 فقط در گروه ال کارنیتین کاهش معنی دار یافت، اگرچه همزمانی تمرین و ال کارنیتین نیز باعث کاهش آن شد که می‌تواند منجر به فعال سازی BAT با افزایش مصرف کالری برای ایجاد گرمایی بدون لرز از طریق ایجاد

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تجویز ۱۲ هفته‌ال-کارنیتین به تنهایی باعث کاهش بیان ژن miR-155 شده است، ولی HIIT به تنهایی و همزمانی آن با ال کارنیتین تأثیر معنی داری بر آن نداشت. با توجه به محدودیت در پژوهش‌های مرتبط با ال کارنیتین و miR-155 و مداخلات ورزشی، به بررسی نقش آنها با عوامل مرتبط با قهوه‌ای شدن بافت چربی پرداخته می‌شود. در مورد تغییرات BAT با ال کارنیتین می‌توان آن را برای قهوه‌ای شدن ضروری دانست زیرا، در پژوهش Ozaki و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شده که عوامل ارثی باعث کمبود سیستمیک و جذب کارنیتین در رت‌های استئاتوز احشایی می‌شود. این سوپه از رت‌ها دمای بدن پایین‌تر و غلظت کارنیتین کمتر در BAT را نشان می‌دهند؛ زیرا از نظر مورفولوژیکی، سلول‌های BAT آنان حاوی واکوئل‌های لیپیدی بزرگ و میتوکندری‌های کوچک، مشابه سلول‌های موجود در WAT هستند. همچنین سطح بیان mRNA و UCP-1 آنان در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی پایین است. زمانی که این رت‌ها ۵ تا ۱۰ روزه به صورت زیر جلدی با ال کارنیتین یک بار در روز تحت درمان قرار گرفتند، افزایش قابل توجهی در دمای بدن و غلظت کارنیتین در BAT، همراه با بازیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی طبیعی و افزایش بیان mRNA و UCP-1 را نشان دادند که بیشترین تغییرات در ۱۰ روز اول رخ داد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که کارنیتین برای حفظ عملکرد و مورفولوژی طبیعی BAT ضروری است (۱۸)، از طرفی miR-155 یکی از تنظیم کننده‌های منفی چربی‌زایی قهوه‌ای است که در تکثیر سلول‌های پیش چربی قهوه‌ای به شدت بیان شده و با تمایز سلولی کاهش می‌یابد. miR-155 به طور منفی توسط C/EBP $\beta$  تنظیم می‌شود، بنابراین یک حلقه بازخورد دوگانه تشکیل می‌دهد (شکل ۲) (۱۷-۱۵).



شکل ۲. ایجاد یک حلقه بازخورد مضاعف و تنظیم miR-155 توسط C/EBP $\beta$  (۱۵)

تغییر در بیان PGC-1 $\alpha$ ، PPAR- $\gamma$  و در نهایت تغییر بیان UCP-1 شود (۱۵، ۳).

در پژوهش حاضر بیان پروتئین C/EBP $\beta$  در همه گروه‌ها نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشت، اما بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که نشان از افزایش مشابه C/EBP $\beta$  در گروه‌ها داشت، اگر چه میانگین گروه T بالاتر بود. این نتایج ممکن است نشان از تاثیرپذیری C/EBP $\beta$  با ال-کارنیتین، HIIT و همزمانی آنها باشد. در پژوهشی همسو shen و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تمرین باعث افزایش C/EBP $\beta$  شده و PGC-1 $\alpha$  را فعال می‌کند که باعث تسهیل تبدیل بافت چربی سفید به قهوه‌ای می‌شود (۲۹). در پژوهشی مغایر پژوهش حاضر Khalafi و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند پس از ۱۲ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا C/EBP $\beta$  کاهش می‌یابد (۸). یکی از دلایل مغایرت نوع بافت مورد بررسی یا مصرف ال-کارنیتین در پژوهش حاضر بود که با کاهش miR-۱۵۵ زمینه افزایش C/EBP $\beta$  فراهم شد. به طور کلی C/EBP $\beta$  رونویسی C/EBP $\alpha$  را افزایش داده و PGC-1 $\alpha$  و - $\gamma$  PPAR را که محرک‌های اصلی رونویسی بیان ژن چربی‌زا و القاء کننده رونویسی کلیدی بیان UCP-1 و برنامه ترموزینیک است را فعال می‌کند (۱۶). به عبارتی دیگر افزایش C/EBP $\beta$  عاملی برای جلوگیری از فعالیت miR-۱۵۵ و افزایش فعالیت PGC-1 $\alpha$  می‌باشد که تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندری و یک فعال کننده اولیه PPAR- $\gamma$  بوده و مستقیماً توسط پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) و مسیر SIRT1 تنظیم می‌شود و باعث افزایش فعالیت BAT از طریق افزایش فعالیت UCP-1 می‌شود (۳۱، ۳۰).

در پژوهش حاضر بیان پروتئین PGC-1 $\alpha$  با تجویز ال-کارنیتین و تمرین به تنهایی افزایش یافت ولی همزمانی تمرین و ال-کارنیتین بر آن تأثیری نداشت، اگر چه به عنوان تنظیم کننده مسیر اصلی بیوژنز میتوکندری در BAT افزایش نشان داد که همسو با تحقیقات گذشته بود (۱۸، ۸). یافته‌های پژوهش‌های گذشته نشان داده که PGC-1 $\alpha$  پس از انجام ۱۲ هفته HIIT (۸)، هشت هفته تمرین استقامتی (۳۲)، هشت هفته تمرین هوازی، (۳۳) در بافت چربی افزایش می‌یابد. در پژوهشی همسو Zhang و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که تمرین ورزشی در واقع باعث افزایش فعالیت مسیر PPAR- $\gamma$  / PGC-1 $\alpha$  و افزایش تعداد سلول‌های چربی قهوه‌ای شده (۳۴) و ممکن است با آزادسازی میوکین‌های مشتق از عضله مانند FNDC5، قهوه‌ای شدن WAT را افزایش دهد (۱۱)، بنابراین بیان بیش از حد PGC-1 $\alpha$  باعث افزایش فنوتیپ قهوه‌ای در سلول‌های چربی سفیدی که قبلاً تمایز یافته‌اند می‌شود، از

طرفی ال-کارنیتین هم با افزایش PGC-1 $\alpha$  که تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندری است زمینه قهوه‌ای شدن را فراهم کرد (۱۸). این سازگاری‌های رونویسی به ظرفیت اکسیداسیون اسیدهای چرب بالاتر تبدیل می‌شود. به طور کلی می‌توان گفت که PGC-1 $\alpha$  با محدودیت کالری و تمرین ورزشی باز تنظیم می‌شود (۳۶، ۳۵). این امر موجب بهبود مصرف کالری شده و در کنترل وزن نقش دارد، که بر اساس پژوهش حاضر کارنیتین موجب کاهش miR-۱۵۵ و افزایش C/EBP $\beta$  و PGC-1 $\alpha$  شده تا وزن گروه L نسبت به گروه C کاهش غیرمعنی‌دار یابد که ممکن است ناشی از فعالیت پایین‌تر و مصرف کالری کمتر BAT در گروه L باشد، از طرفی HIIT نتوانست تغییری در miR-۱۵۵ به وجود آورد که ممکن است فعال سازی یا مهار آن مستقل از تمرین باشد که پژوهش‌های گذشته نشان داد سرما می‌تواند باعث کاهش miR-۱۵۵ از طریق حس سرما و لرزش بدن ناشی از تحریک سیستم عصبی مرکزی شود (۲۱). از طرفی HIIT باعث افزایش C/EBP $\beta$  و PGC-1 $\alpha$  شد که ضمن تأکید بر تأثیر تمرین بر مسیر فعال سازی BAT (۳۴) باعث افزایش مصرف کالری در حین تمرین و بعد از آن شده (۲۰، ۸) و موجب کاهش معنی‌دار وزن نسبت به گروه L و C شد. همچنین همزمانی تمرین و ال-کارنیتین باعث کاهش غیر معنی‌دار miR-۱۵۵ و افزایش غیر معنی‌دار PGC-1 $\alpha$  شده و زمینه فعال سازی BAT و افزایش مصرف کالری و کاهش وزن در کنار تمرین را فراهم کرد. افزایش بیوژنز میتوکندری با کاهش miR-۱۵۵ و افزایش C/EBP $\beta$  و PGC-1 $\alpha$  امکان پذیر بوده که توسط مسیر AMPK و مسیر SIRT1 تنظیم می‌شود (۳۱، ۳۰)، این امر منجر به افزایش بیوژنز میتوکندری و افزایش مصرف کالری ناشی از تمرین و بعد از آن شده (۲۰، ۸) و کاهش وزن را در پی خواهد داشت که همسو با آن وزن در گروه T و TL کاهش معنی‌دار یافت. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم سنجش چربی احشایی و چربی زیر پوستی و عدم وجود گروه کنترل معمولی بدون چاقی اشاره کرد تا امکان مقایسه آن با سایر گروه‌ها فراهم شود.

تحلیل کلی نتایج حاضر نشان داد که HIIT تأثیری بر بیان miR-۱۵۵ نداشت اما سبب افزایش C/EBP $\beta$  و PGC-1 $\alpha$  شد که نشان از فعالیت مسیرهای بالادستی دیگری در افزایش بیوژنز میتوکندری و قهوه‌ای شدن WAT داشت و باعث کاهش وزن شد. از طرفی تجویز ال-کارنیتین باعث کاهش miR-۱۵۵ و افزایش C/EBP $\beta$  و PGC-1 $\alpha$  شد که نشان از تأثیر تغذیه بر افزایش فعالیت مسیر قهوه‌ای شدن WAT بود ولی تأثیری بر وزن نداشت، همچنین همزمانی HIIT و ال-کارنیتین بر بیان miR-۱۵۵، PGC-1 $\alpha$  و وزن تأثیری نداشت. با توجه به اینکه

**سپاسگزاری:** نویسندگان از همکاران آزمایشگاه تحقیقاتی سارا تشکر می‌کنند. در ضمن هیچ گونه تعارض منافی در اجرای پژوهش بین نویسندگان وجود نداشت.

این اولین پژوهش در بررسی اثر همزمانی HIIT و ال کارنیتین بر بیان miR-155، C/EBP $\beta$  و PGC-1 $\alpha$  است، لذا نتیجه‌گیری مستلزم انجام تحقیقات بیشتر با انواع پروتکل‌های تمرینی و استفاده از دوزهای مختلف ال کارنیتین برای روشن‌تر شدن موضوع است.

## References

- Hajizadeh oghaz M, Kadkhoda G, Zarkesh M, Hosseinzadeh N, Saidpour A, Hedayati M. Association of some dietary intakes, anthropometric measurements and insulin resistance with the relative P53 gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue in obese, and non-obese subjects %J Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology. 2020;15(2):21-32.
- Sandoval-Bórquez A, Carrión P, Hernández MP, Pérez JA, Tapia-Castillo A, Vecchiola A, et al. Adipose tissue dysfunction and the role of adipocyte-derived extracellular vesicles in obesity and metabolic syndrome. *Journal of the Endocrine Society* 2024;8(8).
- Karzeni E, Astier J, Tourniaire F, El Abed M, Romier B, Gouranton E, et al. Obesity-associated inflammation induces microRNA-155 expression in adipocytes and adipose tissue: outcome on adipocyte function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2016;101(4):1615-26.
- Ozcan sinir G, Suna S, Inan S, Bagdas D, Tamer CE, Copur OU, et al. Effects of long-term consumption of high fructose corn syrup containing peach nectar on body weight gain in sprague dawley rats. *Food Science* 2017;37:337-43.
- Afonso MS, Verma N, van Solingen C, Cyr Y, Sharma M, Perie L, et al. MicroRNA-33 inhibits adaptive thermogenesis and adipose tissue beiging. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2021;41(4):1360-73.
- Di W, Amdanee N, Zhang W, Zhou YJLs. Long-term exercise-secreted extracellular vesicles promote browning of white adipocytes by suppressing miR-191a-5p. *Life sciences* 2020;263:118464.
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012;481(7382):463-8.
- 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.
- Liu J, Wang Y, Lin LJAPSB. Small molecules for fat combustion: targeting obesity. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2019;9(2):220-36.
- Picard F, Géhin M, Annicotte J-S, Rocchi S, Champy M-F, O'Malley BW, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 2002;111(7):931-41.
- 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.
- Bonet ML, Oliver P, Palou AJBeBA-M, Lipids CBo. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013;1831(5):969-85.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BMJG, development. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes & development* 2013;27(3):234-50.
- 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.
- Chen Y, Siegel F, Kipschull S, Haas B, Fröhlich H, Meister G, et al. miR-155 regulates differentiation of brown and beige adipocytes via a bistable circuit. *Nature communications* 2013;4(1):1-13.
- Carmona MC, Hondares E, Rodriguez De La Concepcion ML, Rodríguez-Sureda V, Peinado-Onsurbe J, Poli V, et al. Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBP $\beta$ . *Biochemical Journal* 2005;389(1):47-56. <https://doi.org/10.1042/BJ20050009>
- Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs can modulate in vivo and in vitro insulin sensitivity. *Cell* 2017;171(2):372-84. e12.
- Ozaki K, Sano T, Tsuji N, Matsuura T, Narama IJLi. Carnitine is necessary to maintain the phenotype and function of brown adipose tissue. *Laboratory investigation* 2011;91(5):704-10.
- Bodea F, Bocea A, Decea NJPE, Diabetes, Metabolism. L-carnitine decreases oxidative stress induced by experimental hypobaric hypoxia. *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism* 2010;16(2):78-81.
- Amirsasan R, Khodaei, O., Vakili, J. Effect of High Intensity Interval Training (HIIT) and aerobic continuous training on lipid profile, physiological indicators and aerobic and anaerobic performance in sedentary male. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology, Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology* 2017;4(1):28-36.[in Persian].
- 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):1-9.
- McKie GL, Wright DCJBJ. Biochemical adaptations in white adipose tissue following aerobic exercise: from mitochondrial biogenesis to browning. *Biochemical Journal* 2020;477(6):1061-81.

23. Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CVJJoAP. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *Journal of Applied Physiology* 1979;47(6):1278-83.
24. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhas-DE-Castro R, De-Castro CB, Curi R, et al. A program of moderate physical training for wistar rats based on maximal oxygen consumption. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 2007;21(3):751-6.
25. 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. 2016;19(5):227-32.
26. Sari Saraf V, Amirasan, R., Jahangiri, M., A textbook of Recovery in sports. University of Tabriz Publication Office 2017:72-91. [in Persian].
27. 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):238-41.
28. Gaudet AD, Fonken LK, Gushchina LV, Aubrecht TG, Maurya SK, Periasamy M, et al. miR-155 deletion in female mice prevents diet-induced obesity. *Scientific reports* 2016;6(1):1-13.
29. Shen Y, Zhou H, Jin W, Lee HJBos. Acute exercise regulates adipogenic gene expression in white adipose tissue. *Biology of sport* 2016;33(4):381-91.
30. Zhang X, Zhang Q, Wang X, Zhang L, Qu W, Bao B, et al. Dietary luteolin activates browning and thermogenesis in mice through an AMPK/PGC1 $\alpha$  pathway-mediated mechanism. *International journal of obesity. nature* 2016;40(12):1841-9.
31. Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppar $\gamma$ . *Cell* 2012;150(3):620-32.
32. Ringholm S, Grunnet Knudsen J, Leick L, Lundgaard A, Munk Nielsen M, Pilegaard HJPo. PGC-1 $\alpha$  is required for exercise-and exercise training-induced UCP1 up-regulation in mouse white adipose tissue. *PloS one* 2013;8(5):e64123.
33. Mu W-J, Zhu J-Y, Chen M, Guo LJIJoMS. Exercise-mediated browning of white adipose tissue: its significance, mechanism and effectiveness. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22(21):11512.
34. Zhang J, Kibret BG, Vatner DE, Vatner SF. The role of brown adipose tissue in mediating healthful longevity. *Journal of Cardiovascular Aging* 2024;4:17.
35. Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, Basaraba SA, Wright DCJTJop. Exercise and adrenaline increase PGC-1 $\alpha$  mRNA expression in rat adipose tissue. *The Journal of physiology* 2009;587(7):1607-17.
36. Finley LW, Lee J, Souza A, Desquiret-Dumas V, Bullock K, Rowe GC, et al. Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109(8):2931-6.

## Synergistic Effects of Twelve Weeks of High-intensity Interval Training (HIIT) and L-carnitine Supplementation on Mir-155, C/EBP $\beta$ and PGC-1 $\alpha$ Gene Expression in White Adipose Tissues of Obese Male Rats

Sari-Saraf V<sup>\*1</sup>, Khani M<sup>2</sup>, Mehdi Saghi M<sup>3</sup>

1-\*Corresponding author: Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email: sarraf@tabrizu.ac.ir

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

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

Received 20 Sep, 2024

Accepted 11 Jan, 2025

**Background and Objectives:** Decreased mitochondrial activity of adipose tissues is one of the potential causes of obesity. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of high-intensity interval training and L-carnitine supplementation on the expression of mir-155, C/EBP $\beta$  and PGC-1 $\alpha$  in subcutaneous fat tissues.

**Materials and methods:** After 8-w induction of obesity, 36 male Wistar rats were randomly divided into four groups of Control (C), Training (T), L-carnitine (L) and Training-L-carnitine. Daily gavage with 30 mg/kg body weight L-carnitine and high-intensity interval training protocol of 85–90% maximum speed on treadmill were carried out 5 d/w for 12 w. The expression of mir-155 gene was assessed using qReal-TimePCR and C/EBP $\beta$  and PGC-1 $\alpha$  using Western blot. Data analysis was carried out using two-way ANOVA at a significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The expression of mir-155 gene in L group significantly decreased, compared to T and C groups ( $p < 0.001$ ). In addition, a significant increase in C/EBP $\beta$  and PGC-1 $\alpha$  gene expression was observed in all L, T and TL groups, compared to C group ( $p < 0.05$ ). The simultaneous effect of training and l-carnitine on mir-155 and PGC-1 $\alpha$  gene expression was not observed ( $p < 0.05$ ); however, this effect on C/EBP $\beta$  gene expression was significant ( $p < 0.05$ ). The weight of the T and TL groups decreased significantly, compared to C and L groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Simultaneous high-intensity interval training and L-carnitine included no significant effects on the increase of upstream factors of adipose tissue browning. The L-carnitine increased mitochondrial biogenesis by decreasing mir-155, high-intensity interval training increased mitochondrial biogenesis by changing no mir-155 and training-induced weight loss occurred, However, more studies are needed in this area.

**Keywords:** L-carnitine, High intensity interval training, mir-155, C/EBP $\beta$  and PGC-1 $\alpha$