

Original Article

The effect of eight weeks high- intensity interval training alone and combined with resistance training on miR-33b expression in PBMCs of overweight/obese women

Zhaleh Pashaei¹, Afshar Jafari^{*2,3}, Mohammad Reza Alivand⁴

¹Ph.D. Student, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

²Department of Biological Sciences in Sports, Faculty of Sport Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

⁴Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: af_jafari@sbu.ac.ir

Received: 13 December 2018 Accepted: 30 January 2019 First Published online: 30 Dec 2020
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020-2021; 42(5):601-609

Abstract

Background: The expression of microRNAs as epigenetic regulators of lipid metabolism pathways disrupt in obese condition, in this regard miR-33b has particular importance. Therefore, the present study was conducted to determine the effect of eight-week high- intensity interval training (HIIT) alone and combined with resistance training (CHRT) on miR-33b expression in overweight/ obese middle-aged women.

Methods: Twenty-four middle-aged overweight/obese women participated in two homogeneous HIIT (5 days/week, n=12) and CHRT (3 day/week HIIT with 2 day/week resistance training, n=12) groups for eight-week. The HIIT protocol consisted of alternating bouts of high-intensity exercise at 80%–85% of VO₂max with active breaks at 60% of VO₂max and resistance training protocol conducted to circuit-weight training with 75-80% of 1-RM. MiR-33b expression levels were measured by real time- PCR 48h before and after the training protocols.

Results: The miR-33b expression levels were increased in both groups but was significant only in the CHRT group (6.02 fold, p=0.002). However, there was no significant difference between miR-33b expression levels in two groups.

Conclusion: According to significant effect of CHRT on miR-33b expression as epigenetic lipid metabolism indicator, CHRT protocol can be considered as a non-pharmacological method for treatment of metabolic disorders associated with obesity.

Keywords: Overweight/Obesity, High-Intensity Interval Training, Combined Training, Mir-33b, PBMCs

How to cite this article: Pashaei Zh, Jafari A, Alivand MR. [The effect of eight weeks high- intensity interval training alone and combined with resistance training on miR-33b expression in PBMCs of overweight/obese women]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020-2021;42(5):601-609. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی سرعتی به‌تنهایی و همراه با تمرین مقاومتی بر بیان miR-33b در PBMCs زنان اضافه‌وزن/چاق

ژاله پاشایی^۱، افشار جعفری^{۲،۳}، محمدرضا علیوند^۴

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۲ گروه علوم زیستی ورزش، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
^۳ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، ایران
^۴ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول؛ ایمیل: af_jafari@sbu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۰ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۵): ۶۰۹-۶۰۲

چکیده

زمینه: اخیراً microRNA ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیک متابولیسم چربی معرفی شده‌اند که بیان آن‌ها تحت شرایط چاقی مختل می‌شود که در این بین miR-33b از اهمیت خاصی برخوردار است. از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر دو نوع تمرین تناوبی سرعتی (HIIT) به‌تنهایی و همراه با تمرین مقاومتی (ترکیبی CHRT) بر بیان miR-33b در زنان میانسال مبتلا به اضافه‌وزن/چاقی انجام شد.
روش کار: ۲۴ زن میانسال مبتلا به اضافه‌وزن/چاقی به مدت ۸ هفته (۵ روز/هفته) در دو گروه همگن (۱۲ نفری) تمرین HIIT به‌تنهایی و ترکیبی CHRT (۳ روز HIIT و ۲ روز تمرین مقاومتی) شرکت کردند. تمرین HIIT شامل وهله‌های دوییدن به‌صورت پنج تکرار چهار دقیقه‌ای با توان هوازی بیشینه ۸۰ تا ۸۵٪ و دو دقیقه استراحت فعال با توان هوازی بیشینه ۶۰٪ بین تکرارها بود و برنامه تمرین مقاومتی نیز به‌صورت دایره‌ای و با ۷۵-۸۰٪ RM۱-انجام شد. بیان miR-33b طی ۴۸ ساعت قبل و بعد از دوره تمرین، به‌روش Real-time PCR ارزیابی شد.
یافته‌ها: میزان بیان miR-33b در هر دو گروه افزایش یافت اما تنها در گروه CHRT معنی‌دار بود (۶/۰۲ برابر، P=۰/۰۰۲)؛ با این وجود، تفاوت بین miR-33b میان دو گروه معنی‌دار نبود.
نتیجه‌گیری: با توجه به اثر معنی‌دار تمرین CHRT بر بیان miR-33b به‌عنوان شاخص اپی‌ژنتیک متابولیسم چربی، می‌توان از تمرینات CHRT به‌عنوان روش درمان غیردارویی برای درمان برخی از اختلالات متابولیکی مرتبط با چاقی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: اضافه‌وزن/چاقی، تمرین تناوبی سرعتی، تمرین ترکیبی، miR-33b، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

نحوه استناد به این مقاله: پاشایی ژ، جعفری ا، علیوند م ح. تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی سرعتی به‌تنهایی و همراه با تمرین مقاومتی بر بیان miR-33b در PBMCs زنان اضافه‌وزن/چاق. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۵): ۶۰۹-۶۰۲

حق تالیف برای مولفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر گردیده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

بررسی‌های سازمان بهداشت جهانی بیان‌گر این است که چاقی در میان زنان شیوع بیشتری نسبت به مردان دارد و به‌سرعت در سطح جهان در حال افزایش است (۱). چاقی یک بیماری چندعاملی می‌باشد که عوامل محیطی و ژنتیک در آن دخالت دارند و به‌معنی تجمع توده چربی اضافی است که با برهم زدن هومئوستاز متابولیسم چربی می‌تواند باعث بروز اختلالات متعدد مانند ناهنجاری‌های متابولیک، دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع سرطان گردد (۲).

طی سال‌های اخیر به نقش میکروریبونوکلیک‌اسید (miRNA) در توسعه اختلالات متابولیکی ناشی از چاقی توجه زیادی شده است. miRNA ها مولکول‌های پروتئینی غیرکدکننده (۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتیدی) می‌باشند که از طریق اتصال به نواحی خاص غیرقابل ترجمه ۳' (Untranslated Regions 3') mRNA ژن‌ها، بیان بسیاری از ژن‌ها را در مرحله رونویسی یا پس‌ترجمه‌ای تنظیم کرده و از این طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلفی را کنترل می‌کنند (۳). از این‌رو هر گونه اختلال در بیان miRNA های ویژه، تحت شرایط عدم تندرستی از قبیل چاقی، می‌تواند منجر به اختلال در بیان ژن‌های هدف و بروز بیماری‌ها گردد (۲). در این راستا، مطالعات نشان داده است که بیان miR-33a/b به‌عنوان تنظیم‌کننده اپی‌ژنتیک مسیرهای متابولیکی چربی در افراد چاق مختل می‌شود، آن‌ها در درون اینترون‌های Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) (SREBP) رمزگذاری می‌شوند. خانواده SREBP شامل SREBP-1a/c و SREBP-2 می‌باشد که توسط ژن‌های SREBP-1 و SREBP-2 رمزگذاری می‌شوند و برای حفظ هومئوستاز چربی ضروری می‌باشند. آن‌ها در پاسخ به تغییرات اسیدهای چرب و کلسترول فعال می‌شوند. SREBP-2 ژن‌های مرتبط با کلسترول، SREBP-1c ژن‌های درگیر در متابولیسم اسید چرب و SREBP-1a نیز هر دو گروه ژن‌ها را کنترل می‌کند که miR-33b درون اینترون ۱۷ ژن SREBP-1 رمزگذاری می‌شود. ژن miR-33b به‌همراه ژن میزبان خود، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی در حفظ حالت پایدار کلسترول سلول و به‌عنوان یکی از فاکتورهای هدف برای تشخیص زودهنگام و درمان بیماری‌های متابولیکی مرتبط با چاقی معرفی شده است (۴). SREBP ها در رونویسی ژن‌های درگیر در تولید کلسترول، اسید چرب و تری‌گلیسرید نقش دارند (۵)، به‌طوری‌که مطالعات اخیر نشان داده‌اند miR-33 از طریق تنظیم منفی SREBP-1، بیان ژن‌های لیپوژنیک را کاهش می‌دهد (۶). یافته‌های حاصل از مطالعات حیوانی بیان‌گر این است که کاهش تدریجی بیان miR-33 بر اثر ممانعت دارویی، منجر به افزایش میزان تری‌گلیسرید گردش خون، تجمع چربی کبدی و در نتیجه پیشرفت سندروم متابولیک می‌شود (۷).

نکات کاربردی

با توجه به تأثیرات مثبت تمرین CHRT بر الگوی بیان miRNA جهت مدیریت مطلوب شرایط اضافه‌وزنی و چاقی، تمرین HIIT در ترکیب با تمرین مقاومتی به‌عنوان روش درمانی غیردارویی مورد استفاده افراد اضافه‌وزن/چاق قرار گیرد.

از سوی دیگر، فعالیت ورزشی نقش مهمی در متابولیسم و الگوی بیان اپی‌ژنتیک مرتبط با چاقی دارد و انجام فعالیت ورزشی به‌طور منظم می‌تواند منجر به بهبود پروفایل لیپیدی شده و اختلالات متابولیکی ناشی از چاقی را تعدیل کند (۸). در سال‌های اخیر، بر تمرینات با دوره‌های شدت زیاد (HIIT) تأکید بیشتری می‌شود؛ این نوع تمرینات، تحریک مکانیکی و سازگاری‌های متابولیکی زیادی ایجاد می‌کنند (۹). در صورتی‌که، با توجه به توصیه‌های انجمن پزشکی ورزشی آمریکا (۱۰) برای افراد رده سنی میانسال و نتایج حاصل از برخی مطالعات، انجام تمرینات ترکیبی (استقامتی و مقاومتی) جهت حفظ یا بهبود سلامتی افراد اضافه‌وزن/چاق اثربخشی بالاتری دارد، به‌طوری‌که این نوع تمرینات با افزایش توده عضلانی تأثیرات مطلوبی در وضعیت‌های متابولیکی دارند. به‌علاوه از طریق کاهش تولید اسیدهای چرب و تحریک اکسایش لیپید، منجر به پیشرفت متابولیسم چربی می‌شوند و می‌توانند اثرات مضاعف ناشی از سازوکارهای جبرانی هر دو نوع فعالیت ورزشی را اعمال کنند (۹). با این وجود، برخی مقالات دیگر نتایج متناقضی در رابطه با برتری تأثیرات مطلوب این نوع تمرینات ارائه کرده‌اند (۹، ۱۱). با توجه به دخالت ژن miR-33b بر تنظیم مسیر متابولیکی بدن، کنترل چاقی و بیماری‌های متابولیکی، ابهامات مربوط به سازوکار مولکولی درگیر در بهبود متابولیسم چربی ناشی از انواع تمرینات بدنی و نتایج بسیار محدود مرتبط با بیان ژن miR-33b (۱۲)، مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر هشت هفته تمرین HIIT به‌تنهایی و همراه با تمرین مقاومتی (Combined HIIT and Resistance Training (CHRT)) بر بیان miR-33b در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) زنان مبتلا به اضافه‌وزن/چاقی انجام شد.

روش کار

تحقیق حاضر در قالب طرح‌های نیمه‌تجربی دوگروهی پیش‌آزمون-پس‌آزمون انجام شد. جامعه آماری تحقیق حاضر شامل زنان سالم میانسال (با دامنه سنی ۳۵ تا ۵۰ سال)، غیرفعال، غیرسیگاری و غیرالکلی، مبتلا به اضافه‌وزن/چاقی ($BMI > 25$) بودند. معیارهای ورود آزمودنی‌ها به تحقیق شامل این موارد بود (۱) عدم ابتلا به بیماری‌های متابولیکی و قلبی-عروقی، ناهنجاری‌های عضلانی اسکلتی، نداشتن هر گونه سابقه بیماری و عمل جراحی که نتایج تحقیق حاضر را دست‌خوش تغییر قرار دهد، (۲) عدم

ساعته رژیم غذایی را هر هفته تکمیل می‌کردند، میانگین کالری دریافتی آزمودنی‌ها از طریق رژیم غذایی در هر دو گروه تمرین، توسط نرم‌افزار محاسبه کالری، تقریباً ۲۰۰۰ کیلوکالری/کیلوگرم/روز برآورد شد. جلسات تمرینی HIIT شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن (دویدن با شدت توان هوازی بیشینه ۶۰٪ و حرکات کششی پویا)، وهله‌های دویدن به‌صورت پنج تکرار چهار دقیقه‌ای با توان هوازی بیشینه ۸۵-۸۰٪ و دو دقیقه استراحت فعال با توان هوازی بیشینه ۶۰٪ بین تکرارها بود. شدت تمرین با استفاده از دستگاه ضربان‌سنج پولار (Polar Pacer, Lake Success, NY, USA) کنترل می‌شد. جلسات تمرینی CHRT شامل سه جلسه/هفته تمرین HIIT (مطابق پروتکل توضیح داده شده) و دو جلسه/هفته تمرین مقاومتی دایره‌ای (هشت حرکت پرس پا، پرس سینه، جلوپا سیم‌کش، بالاسینه، زیربغل پارویی سیم‌کش، پشت پا سیم‌کش، زیربغل دست باز سیم‌کش و ساق پا) بود. برنامه تمرینی در هفته اول شامل سه نوبت ۱۰ تا ۱۲ تایی با ۷۰-۶۵/۱-RM و در هفته دوم تا هشتم شامل سه نوبت ۸ تا ۱۰ تایی با ۸۰-۷۵/۱-RM بود. مدت استراحت میان نوبت‌ها و ایستگاه‌ها، به‌ترتیب ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه بود. قبل از شروع حرکت هر ایستگاه، یک نوبت گرم کردن (۱۰ تایی با شدت ۵۰٪ 1-RM و ۶۰ ثانیه استراحت) انجام شد.

نحوه جمع‌آوری نمونه‌های خونی و ارزیابی عوامل بیوشیمیایی
نمونه‌های خونی طی ۴۸ ساعت قبل و بعد از آخرین جلسه دوره تمرینی (قبل و پس از هشت هفته تمرین) به‌صورت ناشتا از آزمودنی‌ها تهیه شد. آزمودنی‌ها جهت خون‌گیری حدود ساعت ۷:۳۰ تا ۸ صبح در آزمایشگاه حضور یافتند و خون محیطی از ورید پیش‌آرنجی به‌روش استاندارد تهیه شد و تمامی مراحل ارزیابی نیز تحت شرایط استاندارد (دمای ۲۶-۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵-۵۰٪) انجام گرفت. کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL و LDL به روش کالری‌متری، کیت شرکت پارس آزمون و با دستگاه Hitachi 912 (کمپانی Roche، ساخت کشور آلمان) ارزیابی شد.

جداسازی PBMC ها و استخراج RNA

پس از جداسازی PBMC ها به‌روش شیب غلظتی فایکول، نمونه‌ها پس از افزودن یک میلی‌لیتر ترایزول (Ribox-RNA extraction reagent، ساخت کره، ۱۳۸-۸۵۹) تا زمان استخراج RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده، در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استخراج RNA ها، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب‌های حاوی PBMCs اضافه شد و پس از سانتریفیوژ، فاز آبی حاوی RNA جدا گردید. حدود ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول افزوده و یک شب در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ و جداسازی

مصرف مکمل (مانند ویتامین‌ها، ضداکسایندها، پروتئین، کراتین و غیره) و عدم مصرف منظم داروهای OTC (Over-the-Counter) حاوی کافئین به‌مدت ۶ هفته قبل از شروع و حین اجرای پروتکل تحقیق، ۳ عدم شرکت منظم در تمرینات ورزشی خاص. در ابتدا، روش اجرای تمامی مراحل و بروز خطرات احتمالی و فواید ناشی از پروتکل تمرینی به آزمودنی‌ها توضیح داده شد، سپس آزمودنی‌های داوطلب، فرم رضایت آگاهانه جهت شرکت در مطالعه را امضا کردند. در طی اجرای پروتکل تحقیق نیز در صورتی که آزمودنی‌ها به هر دلیلی تمایل به ادامه همکاری نداشتند می‌توانستند از پژوهش انصراف دهند و احتمال این وجود داشت که توسط پزشک‌یار از پژوهش کنار گذاشته شوند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق تحقیقاتی منطقه‌ای دانشگاه علوم پزشکی تبریز تایید شده است (IR.TBZMED.REC.1396.485).

پس از انجام ارزیابی‌های اولیه، از بین داوطلبین، ۲۴ نفر انتخاب و به‌صورت تصادفی در دو گروه همگن ۱۲ نفری (تمرین HIIT به‌تنهایی و در ترکیب با تمرین مقاومتی (CHRT)) جایگزین شدند (جدول ۱) و به‌منظور تعیین حجم نمونه مورد نیاز، از نرم‌افزار تحت وب Statstodo استفاده شد. همگن‌سازی گروه‌ها توسط شاخص‌های شاخص توده بدنی، درصد چربی بدنی و توان هوازی انجام گرفت. اندازه‌گیری درصد چربی بدنی با استفاده از ضخامت چین پوستی و کالیپر و با بهره‌گیری از روش سه نقطه‌ای (سه سر بازو، فوق‌خاصره، ران) جکسون و پولاک انجام گرفت (۱۳). یک هفته قبل از شروع تمرینات، میزان قدرت گروه‌های عضلانی و توان هوازی بیشینه (VO_2max) به‌ترتیب با استفاده از آزمون‌های 1-RM (1-Repetition Maximum Test) و نوارگردان بروس برآورد شد. آزمون بروس (دویدن روی نوارگردان) پس از گرم کردن، با سرعت اولیه ۲/۷ کیلومتر بر ساعت و شیب ۱۰ درصد شروع شده و سپس در هر مرحله (هر سه دقیقه یک‌بار)، شیب و سرعت تا سرحد واماندگی افزایش پیدا کرد. سپس برای ارزیابی توان هوازی بیشینه، از فرمول $VO_2max = 0.03 + (2.74 * time)$ استفاده شد.

پروتکل‌های تمرین

تمامی آزمودنی‌ها، به‌مدت هشت هفته (پنج جلسه در هفته) در تمامی جلسات تمرینی مبتنی بر جدیدترین دستورالعمل‌های تجویز شده برای حفظ سلامتی شرکت داشتند (۱۴). طی دو هفته دوره آماده‌سازی، برنامه تمرینی برای هر دو گروه نیز با هزینه کالریک ۲ کیلوکالری/کیلوگرم/روز شروع شد و تا هفته دوم در هر جلسه به میزان ۰/۵ کیلوکالری/کیلوگرم/روز به هزینه کالری تمرینی افزوده شد. در هفته ۳ تا ۱۰، هزینه کالری تمرینی در میزان ۶ کیلوکالری/کیلوگرم/روز ثابت باقی ماند. لازم به ذکر است که در طی ۸ هفته پروتکل تمرینی، تمامی آزمودنی‌ها فرم یادآمد ۲۴

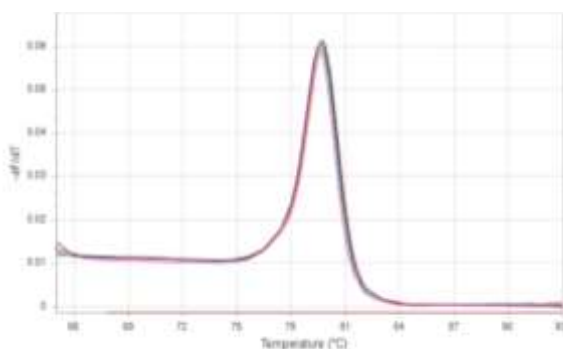
U6 (STL): GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAA ATA T-3', forward: 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3', reverse: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از تبدیل میانگین CT برای هر نمونه به داده‌های نهایی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳، تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ($M \pm SD$) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ (SPSS/IBM, Chicago, IL, USA) در سطح معنی‌داری برابر و کمتر از پنج درصد انجام شد. برای بررسی وضعیت طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک استفاده شد و پس از تایید وضعیت طبیعی داده‌ها و وضعیت همگنی گروه‌های مورد مطالعه (با استفاده از آزمون تی مستقل)، تفاوت‌های درون‌گروهی و بین‌گروهی داده‌ها با استفاده از آزمون‌های تی زوجی و مستقل بررسی شد. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

یافته‌ها

پس از ارزیابی نرمال بودن داده‌ها، تجزیه تحلیل آماری انجام شد که نتایج حاصل در جدول ۱ آورده شده است. با این‌حال، بررسی CT (شکل ۱) تبدیل شده به داده‌های نهایی نشان داد تمرین HIIT و CHRT به ترتیب منجر به افزایش غیرمعنی‌دار ($P > 0/05$) به میزان ۵/۴۳ برابر و افزایش معنی‌دار ($p = 0/002$) به میزان ۶/۰۲ برابر در سطوح miR-33b شد. هرچند، تفاوت میزان miR-33b میان گروه‌های HIIT و CHRT پس از هشت هفته تمرین معنی‌دار نبود ($p > 0/05$) (شکل ۲).



شکل ۱. منحنی ذوب برای یک نمونه قبل و بعد از هشت هفته تمرین HIIT و CHRT

رسوب، یک میلی‌لیتر اتانول اضافه گردید و ورتکس و سانتریفیوژ شد. سپس رسوب مورد نظر در ۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با دستگاه نانودراپ (NanoDrop مدل ONE^C، ساخت شرکت ترمو آمریکا) بررسی گردید و تا زمان تولید cDNA در دما منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تولید cDNA و ارزیابی بیان microRNA ها

ابتدا طی مراحل زیر cDNA تولید شد: ۱ میکرولیتر DNTP، ۲ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر پرایمر Stemloop (STL) میکرو RNA مورد نظر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Fisher Scientific) و حجم مورد نظر از RNA را ریخته و سپس مخلوط مورد نظر با آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس جهت تولید طبق پروتکل سه مرحله‌ای، ۳۰ دقیقه در ۱۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر (Analytikjena - ساخت کشور آلمان) قرار داده شد. نمونه‌های cDNA ساخته شده تا زمان انجام Real-time PCR در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای انجام Real-time PCR ابتدا به تعداد نمونه‌ها یک مستر میکس با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر (۵ میکرولیتر Syber Green Real Q Plus 2xmaster, AMPLIQON,) without ROX (catalog no: A323499, Denmark) ۰/۳ میکرولیتر پرایمر مستقیم (فوروارد) و ۰/۳ میکرولیتر پرایمر معکوس (ریورس)، ۳/۴ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA تهیه شد. یک نمونه به‌عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی (به‌جای cDNA، ۱ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد) آماده شد. بعد از به‌دست آوردن CT (Cycle Threshold) هر نمونه، میانگین آن‌ها محاسبه گردید. جهت آنالیز میزان بیان ژن مورد نظر از ژن مرجع miR-U6 استفاده گردید و میزان بیان ژن نسبت به ژن مرجع (Fold change) با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین گردید (۱۵).

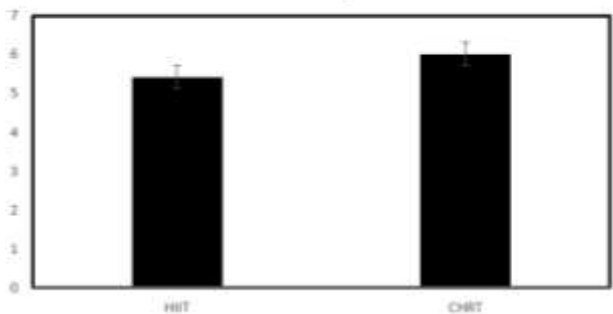
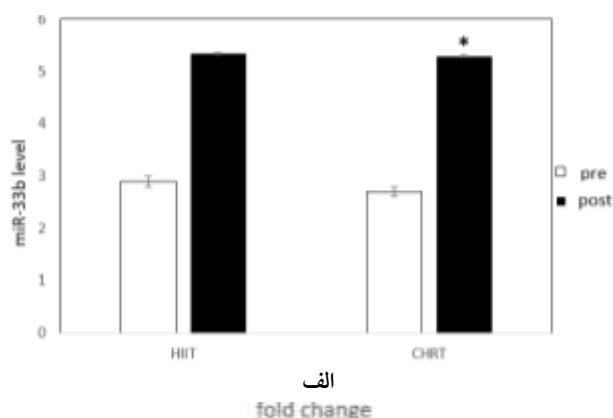
واکنش‌ها به‌صورت سه‌تایی (Triplicate) در دستگاه mic PCR (شرکت سازنده bms، استرالیا) انجام شد. برنامه واکنش‌ها شامل یک مرحله واسرشتی اولیه (۱۰ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و ۴۰ چرخه سه‌مرحله‌ای واسرشتی (۱۰ ثانیه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال (۵ ثانیه با ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و گسترش (۲۰ ثانیه با ۶۰ درجه سانتی‌گراد) بود. توالی پرایمرهای miR-33b و miR-U6 در مراحل ساخت cDNA و Real-time PCR به شرح زیر بود:

miR-33b (STL): 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG CAA TGC A-3', forward: 5'-GGG GGG GTG CAT TGC T-3'

جدول ۱. تغییرات عوامل آنترپومتریک و نیم‌رخ لیپیدی در زنان میانسال مبتلا به اضافه وزن/چاقی شرکت‌کننده در ۸ هفته تمرینات HIIT و CHRT

متغیرها	گروه HIIT			گروه CHRT		
	پیش‌آزمون	پس‌آزمون	P	پیش‌آزمون	پس‌آزمون	P
سن	۴۳/۴±۹/۵	۴۴/۳±۴/۷		۴۴/۳±۴/۷	۴۴/۳±۴/۷	
قد (سانتی‌متر)	۱۵۶/۶۹±۳/۶	۱۵۷/۲۵±۵/۲		۱۵۷/۲۵±۵/۲	۱۵۷/۲۵±۵/۲	
وزن (کیلوگرم)	۷۲/۴۶±۸/۴	۷۴/۲۱±۷/۹	P>۰/۰۵	۷۴/۲۱±۷/۹	۷۳/۱۶±۸/۱	*P=۰/۰۲
نسبت دور کمر به لگن	۰/۸۸±۰/۰۶	۰/۹۰±۰/۰۵	P>۰/۰۵	۰/۹۰±۰/۰۵	۰/۸۷±۰/۰۶	*P<۰/۰۰۱
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر متر مربع)	۲۹/۵±۳/۷	۳۰±۲/۵	P>۰/۰۵	۳۰±۲/۵	۲۹/۵±۳/۷	*P=۰/۰۲
توان هوازی بیشینه (میلی لیتر/کیلوگرم/دقیقه)	۳۰/۵۸±۹/۸۵	۳۳/۷۲±۷/۸۶	*P<۰/۰۰۱	۳۳/۷۲±۷/۸۶	۴۴/۲۹±۸/۴۷	*P<۰/۰۰۱
میانگین RM ^۱ (کیلوگرم)	۲۷/۱۹±۲/۴۱	۲۹/۴۵±۵/۵۸۷	*P=۰/۰۰۱	۲۹/۴۵±۵/۵۸۷	۴۰/۲۴±۵/۹۳	*P<۰/۰۰۱
درصد چربی بدنی	۴۲/۹۹±۳/۴	۴۳/۷±۲/۵	*P<۰/۰۰۱	۴۳/۷±۲/۵	۳۶/۹±۳/۴	*P<۰/۰۰۱
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۹۹±۱۰/۴	۲۰۰/۵۸±۹/۹	*P=۰/۰۵	۲۰۰/۵۸±۹/۹	۱۷۱/۱۷±۳۰/۹	*P<۰/۰۰۱
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۶۸/۴۲±۱۳/۰	۱۶۸/۹۲±۱۱/۷	*P<۰/۰۰۱	۱۶۸/۹۲±۱۱/۷	۱۴۷/۱۷±۱۰/۶	*P<۰/۰۰۱
HDL (میلی گرم بر دسی لیتر)	۳۲/۱۷±۵/۱	۳۳/۸۳±۴/۰	*P=۰/۰۱	۳۳/۸۳±۴/۰	۴۰/۷۵±۵/۸	*P=۰/۰۰۱
LDL (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۳۷/۵۷±۱۰/۴	۱۳۲/۹±۹/۶	*P<۰/۰۰۱	۱۳۲/۹±۹/۶	۱۰۱/۰۲±۳۳/۷	*P=۰/۰۰۷

* نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) درون گروهی، \neq نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروهی می‌باشد. پروتکل HIIT شامل تمرینات شدید تناوبی و پروتکل CHRT ترکیبی از تمرینات شدید تناوبی همراه با تمرینات مقاومتی است.



ب

شکل ۲. تأثیر هشت هفته تمرین HIIT و ترکیبی CHRT بر بیان miR-33b در PBMCs زنان میانسال مبتلا به اضافه وزن/چاقی.

(الف) تفاوت قبل و بعد از دو نوع تمرین (ب) تفاوت دامنه اختلافات بین گروهی

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) درون گروهی. پروتکل HIIT شامل تمرینات شدید تناوبی و پروتکل CHRT ترکیبی از تمرینات شدید تناوبی همراه با تمرینات مقاومتی است.

بحث

یافته مطالعه حاضر، همسو با نتایج قارقانی و همکاران (۱۲) نشان داد که بیان miR-33b متعاقب هشت هفته تمرین HIIT و CHRT افزایش می‌یابد. در این راستا، قارقانی و همکاران با بررسی اثر فزاینده تمرینات هوازی بر بیان miR-33 و ژن‌های لیپوژنز در هپاتوسیت‌های حیوانی اشاره داشتند که اثر کاهش لیپوژنزی تمرینات هوازی ممکن است ناشی از القا مسیر اتوفاژی وابسته به miR-33 باشد. لیپوفاژی به‌عنوان یک مسیر اتوفاژی می‌باشد که تری‌گلیسرید، کلسترول و سایر قطرات چربی را تخریب می‌کند و در نهایت اسیدهای چرب آزاد برای تولید انرژی سلولی از مسیر بتا‌اکسیداسیون میتوکندریایی فراهم می‌کند، که قارقانی این موضوع را مسئول تاثیر هاپوپولیدمیک ناشی از فعالیت ورزشی بیان کرده است (۱۲). در این راستا، مطالعات غیرانسانی پیشین نقش بازدارنده miR-33 را بر خروج کلسترول و اکسایش اسیدهای چرب نشان داده‌اند (۱۶)؛ فرآیند ممانعت از بیان miR-33 از طریق تحریک بیان ABCA1 می‌تواند منجر به افزایش HDL پلاسما، و کاهش LDL، TG و گسترش انتقال معکوس کلسترول شود (۱۷). در صورتی که این یافته‌ها متضاد با یافته‌های تحقیق حاضر و قارقانی می‌باشد. افزایش بیان miR-33b در تحقیق حاضر، با افزایش HDL و کاهش LDL، TG و کلسترول همراه بود. به‌علاوه، در برخی از مطالعات اخیر نشان داده شده است که افزایش بیان miR-33 ممکن است در حفظ سطوح بالای HDL و جلوگیری از پیشرفت آترواسکلروزیس اثر بازدارندگی نداشته باشد (۱۸). از سوی دیگر نشان داده شده است ممانعت دارویی از بیان miR-33b در حیوانات می‌تواند منجر به افزایش غلظت چربی خون به‌ویژه TG و VLDL گردش خون (۱۹)، افزایش بیان ژن‌های درگیر در ساخت اسید چرب، کاهش هیدرولیز اسیدهای چرب و افزایش وزن شود (۷). با این حال، طبق یافته‌های تاکاهیرو و همکاران، بیان miR-33b تحت شرایط تخلیه کلسترول افزایش می‌یابد (۲۰)؛ در این صورت miR-33b کاهش میزان SREBP-1c را تشدید می‌کند. SREBP ها در پاسخ به تغییرات میزان اسیدهای چرب و کلسترول فعال می‌شوند و برای حفظ هومئوستاز چربی ضروری می‌باشند (۲۱). SREBP-1c رونویسی ژن‌های درگیر در ساخت اسید چرب و TG (از قبیل استیل‌کوآکربوکسیلاز، اسید چرب سنتاز، elovl-6، استرویل‌کوآ‌دسچوراز) را فعال می‌کند (۵). از این‌رو، در تحقیق حاضر، تاثیر افزایشی هر دو نوع پروتکل تمرینی بر میزان بیان miR-33b را می‌توان با کاهش میزان عوامل لیپیدی تفسیر کرد؛ از سوی دیگر، افزایش بیان miR-33b می‌تواند با کاهش بیان ژن‌های مورد هدف خود از جمله SREBP-1c باعث افزایش لیپولیز و کاهش لیپوژنز گردد (۲۰). به هر حال، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تمرین بدنی میزان بیان ژن‌های لیپوژنیک مانند SREBP-1c و اسید چرب سنتاز را کاهش می‌دهد

(۲۲). پیشنهاد شده است که کاهش SREBP-1c به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق کاهش میزان انسولین به‌عنوان هورمون لیپوژنیک رخ می‌دهد اما مکانیسم مولکولی مستقیم به‌طور کامل درک نشده است (۲۳). SREBP-1 تنظیم‌کننده مهم PPAR γ ، RIP140 و دیگر ژن‌های ضروری برای آدیپوژنز می‌باشد (۲۴،۲۲). بیان این ژن‌ها در شرایط کاهش miR-33 و در نتیجه افزایش SREBP-1c بیشتر می‌شود که می‌تواند منجر به تجمع چربی در کبد و سایر بافت‌ها گردد (۲۴،۲۵). PPAR γ نقش مهمی در فرآیند آدیپوژنز دارد (۲۶)، موتا و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان داده‌اند که تمرین HIIT، لیپوژنز و بیان PPAR γ را در کبد کاهش می‌دهد (۲۷). ژن RIP140 اثر سرکوب‌کنندگی بر بایوژنز میتوکندریایی و متابولیسم اکسایشی دارد (۲۸)؛ از طرفی، باعث افزایش فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپا بی و افزایش بیان ژن‌های درگیر در التهاب (از قبیل: عامل نکروز توموری آلفا، ایترلوکین ۶) در ماکروفاژها می‌گردد (۲۴). بنابراین، بهبود وضعیت لیپولیز و آدیپوژنز ناشی از پاسخ ورزشی فزاینده miR-33b ممکن است در بهبود وضعیت التهابی نیز نقش داشته باشد. به هر حال، در مطالعه حاضر، پاسخ فزاینده بیان miR-33b به تمرینات CHRT بیشتر از HIIT بود؛ این موضوع را می‌توان دلیل وجود تفاوت معنی‌دار در کاهش عوامل لیپیدی بین گروه‌های تمرینی به‌شمار آورد. در این راستا، ارسال و همکاران نیز نشان دادند که هشت هفته تمرین ترکیبی نسبت به تمرین هوازی به‌تنهایی اثر مطلوب‌تری بر برخی شاخص‌های ترکیب بدنی و نیمرخ لیپیدی به‌جا می‌گذارد (۲۹). پاسخ‌های متفاوت هورمونی-متابولیکی ناشی از فشارهای مکانیکی-متابولیکی تمرینات مقاومتی در گروه ترکیبی در مقایسه با تمرینات هوازی ممکن است موجبات تغییرات اپی‌ژنتیک متفاوت شده باشد. به‌طوری‌که فعالیت هوازی با تحریک هورمونی درگیر در لیپولیز موجب تحریک بیشتر اسیدهای چرب در دسترس شود. در حالی که انجام تمرینات مقاومتی یا ترکیبی با تعدیل متفاوت نسبت‌های آنابولیکی/کاتابولیکی در هورمون‌های درگیر ممکن است با افزایش اکسایش بیشتر چربی‌های آدیپوزی و درون‌عضلانی، باعث بهبود برخی از عوامل اپی‌ژنتیک درگیر در سوخت‌وساز اسیدهای چرب شوند (۳۰).

نتیجه‌گیری

در کل، با توجه به اثر بیشتر تمرینات CHRT بر تنظیم اپی‌ژنتیکی متابولیسم چربی (تعدیل پاسخ miR-33b)، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که CHRT به‌عنوان یک روش درمان غیردارویی مورد استفاده در درمان برخی از اختلالات متابولیکی مرتبط با چاقی نسبت به HIIT ممکن است موثرتر واقع شود. هر چند، با توجه به پیچیدگی متابولیسم چربی و تعامل آن با کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها (به‌ویژه در فعالیت‌های ورزشی با شدت، مدت و

تواترهای متفاوت و اثر وضعیت‌های تمرینی و دسترسی به سوبسترا، و با در نظر گرفتن ابهامات و محدودیت‌های موجود در مطالعات قبلی و تحقیق حاضر، باید تاکید کرد که تحقیقات مربوط به اثرات اپی‌ژنتیکی تمرینات بدنی بر عوامل سوخت‌وساز چربی هنوز در ابتدای راه است. بنابراین، برای روشن شدن اثرات و پاسخ‌های اپی‌ژنتیکی این نوع تمرینات در افراد چاق، انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه ضرورت دارد.

قدردانی

از همکاری تمامی آزمودنی‌ها در زمینه اجرای مراحل عملی تحقیق، آزمایشگاه ژنتیک و بیوشیمی علوم پزشکی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی می‌نمایم. لازم به ذکر است که مقاله حاضر، براساس رساله دکتری ثبت شده در دانشگاه تبریز، تهیه شده است.

منابع مالی

بخشی از بودجه تحقیقاتی توسط منابع مالی دانشگاه تبریز و مابقی به‌طور شخصی تامین شده است.

منافع متقابل

نویسندگان هیچ گونه تضاد منافع را اعلام نمی‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی منطقه‌ای اخلاق دانشگاه تبریز استان آذربایجان شرقی به شماره مرجع IR.TBZMED.REC.1396.485 به تایید رسیده است.

مشارکت مؤلفان

ژ.پ. الف. ج و همکاران در طراحی موضوع مقاله، ژ.پ. و همکاران در اجرای مقاله و تحلیل نتایج مطالعه، ژ.پ. الف. ج در تالیف مقاله مشارکت داشته‌اند. ژ.پ. و همکاران نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

- Deiuliis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes (Lond)*. 2016 Jan;40(1):88-101. doi: 10.1038/ijo.2015.170
- Ali AS, Ali S, Ahmad A, Bao B, Philip PA, Sarkar FH. Expression of microRNAs: potential molecular link between obesity, diabetes and cancer. *Obes Rev*. 2011 Dec;12(12):1050-62. doi: 10.1111/j.1467-789x.2011.00906.x
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008 Feb;9(2):102-14. doi: 10.1038/nrg2290
- Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Mar 22;13(4):239-50. doi: 10.1038/nrm3313
- Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, et al. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res*. 2002 Aug;43(8):1220-35.
- Goedeke L, Salerno A, Ramírez CM, Guo L, Allen RM, Yin X, et al. Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice. *EMBO Mol Med*. 2014 Sep;6(9):1133-41. doi: 10.15252/emmm.201404046
- Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriar NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):9232-7. doi: 10.1073/pnas.1102281108
- Kaliman P, Párrizas M, Lanza JF, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Res Rev*. 2011 Sep;10(4):475-86. doi: 10.1016/j.arr.2011.05.002
- Cervantes J, Hernández J. Effect of High-Intensity and Concurrent Training in Body Composition in Costa Rican Overweight and Obese Women. *Arch Sports Med*. 2017;1(2):65-74. doi: 10.36959/987/231
- Reibe D, Ehrman JK, Liguori G, Magal M. American College of Sports Medicine. *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2017.
- Sarmadiyan M, Khorshidi D. Effect of combined training on body composition, lipids levels and indicators of metabolic syndrome in overweight and obese postmenopausal women. *Joge* 2016;1(2):36-44. doi: 10.4103/0973-1482.98977. [In Persian].
- Ghareghani P, Shanaki M, Ahmadi S, Khoshdel AR, Rezvan N, Meshkani R, et al. Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. *Obes Res Clin Pract*. 2018 Jan-Feb;12(Suppl 2):80-89. doi: 10.1016/j.orcp.2017.01.004
- Jackson AS, Pollock ML. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr*. 1978 Nov;40(3):497-504. doi: 10.1079/bjn19780152

14. Simbo SY. Effects of exercise and diet-induced weight loss in overweight/obese women on characterization of serum/white blood cells, microRNAs and cytokine gene transcription. Doctor of Philosophy. Texas: A&M University; 2013.
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
16. Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem*. 2010 Oct 29;285(44):33652-61. doi: 10.1074/jbc.m110.152090
17. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2921-31. doi: 10.1172/jci57275
18. Marquart TJ, Wu J, Lusic AJ, Baldán Á. Anti-miR-33 therapy does not alter the progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Mar;33(3):455-8. doi: 10.1161/atvbaha.112.300639
19. Allen RM, Marquart TJ, Jesse JJ, Baldán A. Control of very low-density lipoprotein secretion by N-ethylmaleimide-sensitive factor and miR-33. *Circ Res*. 2014 Jun 20;115(1):10-22. doi: 10.1161/circresaha.115.303100
20. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, et al. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2883. doi: 10.1038/ncomms3883
21. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125-31. doi: 10.1172/jci0215593
22. Ebrahimi M, Fathi R, Ansari Z, Talebi E, Najafi M. How high-fat diet and high-intensity interval training affect lipid metabolism in the liver and visceral adipose tissue of rats. *Comp Exe Physiol* 2017;14(1):55-62. doi: 10.3920/cep170018
23. Gorgani-Firuzjaee S, Meshkani R. SH2 domain-containinginositol 5-phosphatase (SHIP2) inhibition ameliorates highglucose-induced de-novo lipogenesis and VLDL production through regulating AMPK/mTOR/SREBP1 pathway and ROS production in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med*. 2015;89:679-89. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.036
24. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc*. 2012 Dec;1(6):e003376. doi: 10.1161/jaha.112.003376
25. Morán-Salvador E, López-Parra M, García-Alonso V, Titos E, Martínez-Clemente M, González-Pérez A, et al. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J*. 2011 Aug;25(8):2538-50. doi: 10.1096/fj.10-173716
26. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4333-7. doi: 10.1073/pnas.95.8.4333
27. Motta VF, Aguila MB, Mandarin-DE-Lacerda CA. High-intensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice. *J Sports Med Phys Fitness*. 2016 May;56(5):655-63.
28. Daisuke Hoshino, Yuko Yoshida, Yu Kitaoka, Hideo Hatta, Arend Bonen. High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2013;38:326-33. doi: 10.1139/apnm-2012-0257
29. Arslan E, Can S, Demirkan E. Effect of short-term aerobic and combined training program on body composition, lipids profile and psychological health in premenopausal women. *Science & Sports* 2017;32(2):106-13. doi: 10.1016/j.scispo.2016.11.004
30. Arazi H, Jurbonyan A, Asghari E. Comparison of the Effects of a Combined (Aerobic Resistance) and Aerobic Exercise Training on Vo₂max, Lipid Profile, Blood Glucose and Hypertension in middle-aged men at Risk for Cardiovascular Disease. *JSSU* 2013; 20(5):627-38. [In Persian].