Original Article

The effect of the high intensity interval training on endothelial function concentrating on alterations in miR-16 expression, total antioxidant capacity and serum malondialdehyde in the obese men

Zolfi HR[1], Shakib A[2*]

1- Department of Physical Education and Sport Sciences, Technical and Vocational University (TVU), Tehran, I.R. Iran.
2- Ph.D Student, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R. Iran.

Received: 2022/07/5 | Accepted: 2022/08/17

Abstract:

Background: Endothelial dysfunction, caused by obesity, can be regarded as the initial step in the development of the cardiovascular disease. Hence, the current study aimed to the effects of HIIT exercises on miR-16 induced endothelial function, total antioxidant capacity (TAC) and serum malondialdehyde (MDA) in the obese men.
Materials and Methods: 24 obese male volunteers, with a mean age of 44 years and BMI>30, were randomly divided into the training and control groups. The eight-week HIIT training group did circular exercises, including (Long Knee, Butterfly, Burpy, kettlebell snatch, and Scott Goblet), with an intensity of 80-90 % of Karvonen heart rate (first four weeks: three sessions and second four weeks: four sessions per week). Blood samples were taken from the subjects 48 hours before and after the last training session to analyze miR-16, NO, serum MDA, and TAC indices of the subjects.
Results: Eight weeks of HIIT training in the training group caused a significant increase in NO and TAC values and a significant decrease in serum MDA compared to the pre-test values. ($P<0.05$). Furthermore, compared to the control group, a significant decrease in miR-16 and MDA levels was observed and a significant increase in serum NO and TAC was observed in the training group ($P<0.05$).
Conclusion: HIIT training apparently alter serum NO levels by affecting miR-16 levels and reducing oxidative stress caused by obesity and can prevent from outbreak and development of the cardiovascular disease by improving endothelial function.

Keywords: High intensity interval training, MiR-16, Nitric oxide, Oxidative stress, Obesity

***Corresponding Author**
Email: amirn7373@gmail.com
Tel: 0098 413 477 9011
Fax: 0098 413 477 9065

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, September, 2022; Vol. 26, No 4, Pages 435-445

Please cite this article as: Zolfi HR, Shakib A. The effect of the high intensity interval training on endothelial function concentrating on alterations in miR-16 expression, total antioxidant capacity and serum malondialdehyde in the obese men. ***Feyz*** 2022; 26(4): 435-45.

تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا بر عملکرد اندوتلیالی با تمرکز بر تغییرات بیان miR-16، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و مالون دی‌آلدهید سرمی در مردان چاق

حمیدرضا زلفی[۱]، امیر شکیب[۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: اختلال در عملکرد اندوتلیالی ناشی از چاقی، می‌تواند به‌عنوان اوّلین گام در پیشرفت بیماری قلبی - عروقی در نظر گرفته شود. از این‌رو، تحقیق حاضر به‌منظور بررسی آثار تمرینات HIIT بر عملکرد اندوتلیالی ناشی از miR-16، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و مالون دی‌آلدهید (MDA) سرمی در مردان چاق انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۲۴ مرد داوطلب چاق با میانگین سنی ۳±۴۴ سال و BMI>۳۰، به‌صورت تصادفی به دو گروه تمرین و کنترل تقسیم شدند. گروه تمرینی هشت هفته تمرینات HIIT را به‌صورت دایره‌ای (زانوبلند، پروانه، بورپی، کتل بل‌اسنچ و اسکات گابلت)، با شدت ۹۰-۸۰ درصد ضربان قلب کاروونن اجرا کردند (چهار هفته اوّل: سه جلسه و چهار هفته دوم: چهار جلسه در هفته). نمونه‌های خونی ۴۸ ساعت قبل و بعد از آخرین جلسه تمرینی به‌منظور تحلیل شاخص‌های miR-16، NO، MDA و TAC سرمی از آزمودنی‌ها دریافت شد.

نتایج: هشت هفته تمرین HIIT در گروه تمرین، باعث افزایش معنی‌دار مقادیر NO و TAC و کاهش معنی‌دار MDA سرمی نسبت به مقادیر پیش‌آزمون شد ($P<۰/۰۵$). همچنین، در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری در سطوح miR-16 و MDA و افزایش معنی‌دار NO و TAC سرمی در گروه تمرین مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: احتمالاً تمرینات HIIT با اثرگذاری بر مقادیر miR-16 و کاهش استرس اکسایشی ناشی از چاقی، باعث تغییر مقادیر NO سرمی شده و با بهبود عملکرد اندوتلیالی می‌تواند از بروز بیماری‌های قلبی - عروقی و یا پیشرفت آن جلوگیری کند.

واژگان کلیدی: تمرینات تناوبی با شدت بالا، miR-16، نیتریک‌اکساید، استرس اکسایشی و چاقی

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱، صفحات ۴۴۵-۴۳۵

مقدمه

چاقی، باعث ایجاد چندین تنش سلولی می‌شود که از طریق سازوکارهای مختلفی به بیماری‌های قلبی - عروقی منجر می‌شود و بیشتر آن‌ها در اختلال عملکرد اندوتلیال ریشه دارند. این تنش‌های اصلی عبارتند از: استرس اکسایشی، استرس شبکه آندوپلاسمی و اختلال اتوفاژی [۲،۱]. استرس اکسایشی به‌عنوان عدم تعادل بین دفاع آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال آزاد تعریف می‌شود و یک مسیر رایج است که هنگام چاقی افزایش یافته، چاقی را با سایر عوارض مرتبط می‌کند [۳]. بنابراین، درک بهتر واسطه‌های اختلال عملکرد اندوتلیال ناشی از چاقی کمک می‌کند تا اهداف جدیدی برای مداخلات شناسایی شود که ممکن است از پیشرفت بیماری‌های قلبی - عروقی مرتبط با چاقی جلوگیری کند یا آن را به تعویق بیندازد [۴،۲].

۱. استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، تهران، ایران

۲. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

*نشانی نویسنده مسؤول:

تبریز، دانشگاه تبریز، گروه فیزیولوژی ورزشی

تلفن: ۰۹۳۰۲۳۷۳۷۱۴ دورنویس: ۰۴۱۳۴۷۷۹۰۶۵

پست الکترونیک: Amirn7373@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۴ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۵/۲۶

میکروRNAها (miRNAs)RNAهای کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که در بسیاری از عملکردهای سلولی بیولوژیکی نقش مرکزی دارند [۵]. اختلال در تنظیم microRNAها بر وضعیت و عملکرد بافت‌ها و اندام‌های مختلف از جمله اختلال عملکرد اندوتلیال که به بیماری‌های قلبی - عروقی ناشی از چاقی منجر می‌شود، تأثیر می‌گذارد [۶]. میکروRNAهای مختلف می‌توانند بیان یک ژن هدف را به‌طور مشترک تنظیم کنند. این واقعیت، پیچیدگی بالای شبکه تنظیم‌کنندگی ایجادشده توسط miRNAها و بافت هدف آن‌ها را آشکار می‌کند [۶،۵]. اندوتلیوم به‌عنوان اوّلین نقطه تماس بین اجزای خون و دیواره عروق، به تغییرات در جریان خون یا عوامل شیمیایی با آزاد کردن مولکول‌هایی نظیر نیتریک‌اکساید (NO) Nitric Oxide پاسخ می‌دهد [۷،۲]. مطالعات بالینی نشان داده است که بیماران مبتلا به چاقی سطوح کمتری از سطوح NO را نشان می‌دهند. [۲]. یکی از عوامل مؤثر در کاهش سطوح NO، کاهش بیان eNOS mRNA است. از طرفی دیگر miRNAها نقش مهمّی در تنظیم eNOS دارند [۸،۲]. بنابراین، می‌توان گفت که کاهش eNOS mRNA در طول چاقی ممکن است به‌دلیل تغییر در پروفایل miRNA در طول چاقی باشد. از جمله miRNAهایی که نقش مستقیمی در تنظیم eNOS دارند، miR-16 است [۷،۲]. این miRNA با هدف قرار دادن mRNA آن در 3UTR به‌طور مستقیم

با eNOS تعامل دارند و هنگام چاقی این miRNA افزایش می‌یابد [۸]. نتایج برخی از تحقیقات نشان می‌دهد که مهار miR-16 در مدل‌های حیوانی یا بیماران مبتلا به چاقی در برابر تخریب mRNA ژن eNOS محافظت می‌کند و می‌تواند به‌طور بالقوه از اختلال عملکرد عروقی ناشی از چاقی جلوگیری کند [۲]. تمرینات ورزشی یکی از راهکارهایی است که می‌تواند با تغییر هومئوستاز سلولی بر miRNAهای در گردش تأثیر بگذارد [۹]. از جمله تمریناتی که در رابطه با miRNAها کمتر مورد بررسی قرار گرفته است، تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) High-Intensity Interval Training است که با وهله‌های تمرینی کوتاه و شدت بالا [تقریباً ۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر ضربان قلب (HR)] یا بیش از ۹۰ درصد حداکثر مصرف اکسیژن ($\dot{V}O_2max$) و دوره‌های استراحت یا ریکاوری فعال با شدت متوسط مشخص می‌شود [۱۲-۱۰]. این شیوه تمرینی، از نظر زمانی روشی کارآمد برای به‌دست‌آوردن مزایای فیزیولوژیکی و بالینی همچون بهبود فشار خون، عملکرد اندوتلیال، پروفایل لیپیدی و عملکرد میوکارد می‌باشد [۱۲،۹]. ایزدی و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی تأثیر چندین نوع تمرین HIIT بر روی ۱۰۰ داوطلب چاق گزارش کردند که این تمرینات باعث افزایش میزان NO می‌شود [۱۳]. عطارزاده و همکاران نیز با بررسی زنان غیرفعال چاق و دارای اضافه‌وزن نشان دادند که انجام تمرینات HIIT با افزایش معنی‌دار ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و عدم تغییر مالون آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص‌های اصلی استرس اکسایشی همراه است [۱۴]. همچنین، Fernandes و همکاران در مطالعه‌ای حیوانی بر روی موش‌ها بیان کردند که تمرینات هوازی باعث تنظیم کاهشی miR-16 شده، در نتیجه می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مؤثر در درمان و پیشگیری از بیماری‌های عروقی مطرح باشد [۱۵]. در مقابل پاشایی و همکاران (۲۰۲۱) اظهار داشتند که انجام تمرینات HIIT می‌تواند باعث افزایش بیان miR-16 در زنان چاق گردد [۱۶]. بنابراین با توجه به مطالعات بسیار اندک در مورد آثار تمرینات HIIT بر روی miRNAهای مرتبط با چاقی و عملکرد اندوتلیالی به‌ویژه miR-16، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر تمرین HIIT بر تغییرات بیان miR-16 و شاخص‌های استرس اکسایشی مردان چاق انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر نتیجه طرح پژوهشی در دانشگاه فنی و حرفه‌ای استان آذربایجان شرقی به شماره ۴۱۰/۱۴۰۰/۹۸/۲۵ می‌باشد. پژوهش حاضر در قالب طرح‌های نیمه‌تجربی دوگروهی به‌صورت پیش‌آزمون – پس‌آزمون؛ پس از دریافت کد اخلاق در پژوهش از پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی با شماره SSRI.REC-2110-1322(R1) و اخذ کد کارآزمایی بالینی به شماره IRCT20220128053844N1 اجرا شد. جامعه آماری تحقیق حاضر را مردان میانسال و غیرفعال دارای چاقی تشکیل می‌دادند. آزمودنی‌ها پس از هماهنگی‌های مقدماتی با باشگاه‌های ورزشی معتبر سطح شهر تبریز و ثبت‌نام؛ با مدنظر قرار دادن دامنه سنی ۴۰ تا ۵۰ سال، غیرسیگاری و غیرالکلی‌بودن، غیرفعال‌بودن (بدون مشارکت منظم در فعالیت‌های ورزشی در ۶ ماه گذشته)، شاخص توده بدنی بالای ۳۰، نداشتن بیماری‌های قلبی – تنفسی و عضلانی – اسکلتی و سایر بیماری‌های مزمن انتخاب شدند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- مشخصات آنتروپومتریکی آزمودنی‌ها قبل و بعد از انجام مداخله تمرینی

شاخص	گروه	پیش‌آزمون $\bar{X} \pm SD$	پس‌آزمون $\bar{X} \pm SD$	درون‌گروهی P	بین‌گروهی P
قد	تمرین	۱۷۲/۷۷ ± ۵/۹۳			
	کنترل	۱۷۴/۲۰ ± ۸/۳۷			
سن	تمرین	۴۳/۷۷ ± ۳/۵۲			
	کنترل	۴۴/۳۰ ± ۴/۲۱			
وزن	تمرین	۹۸/۹۷ ± ۹/۷۵	۹۵/۱۴ ± ۱۰/۰۴	P=۰/۰۰۱*	P=۰/۴۵
	کنترل	۹۹/۶۳ ± ۱۴/۶۵	۹۹/۷۰ ± ۱۵/۱۳	P=۰/۸۸	
درصد چربی	تمرین	۳۲/۴۳ ± ۲/۱۷	۲۹/۲۲ ± ۱/۸۸	P=۰/۰۰*	P=۰/۰۲#
	کنترل	۳۱/۷۴ ± ۲/۷۵	۳۱/۸۶ ± ۳/۲۶	P=۰/۹۸	
شاخص توده بدنی (kg/m²)	تمرین	۳۳/۰۵ ± ۲/۲۸	۳۰/۸۶ ± ۱/۹۶	P=۰/۰۰*	P=۰/۲۵
	کنترل	۳۲/۳۳ ± ۱/۷۰	۳۲/۱۷ ± ۲/۷۴	P=۰/۷۵	
حداکثر اکسیژن مصرفی (ml/kg/min)	تمرین	۳۶/۵۷ ± ۱/۴۳	۳۷/۷۱ ± ۱/۰۹	P=۰/۰۰۸*	P=۰/۰۸
	کنترل	۳۶/۶۵ ± ۰/۸۳	۳۶/۷۰ ± ۱/۲۶	P=۰/۰۷	

*: معنی‌داری درون‌گروهی #: معنی‌داری بین‌گروهی

همچنین، مصرف دخانیات و مواد الکلی، مصرف داروهای خاص و کنترل‌کننده وزن بدن و داشتن محدودیت جسمانی و پزشکی برای شرکت و حضور در فعالیت ورزشی از جمله شرایط خروج از مطالعه بود. بدین‌ترتیب، ده روز پیش از شروع برنامه تحقیقی، افراد داوطلب با هدف آشنایی با طرح پژوهشی از جمله شرایط و نحوه انجام تمرینات منتخب ورزشی، اهداف تحقیق و روش‌های جمع‌آوری و اندازه‌گیری اطلاعات و نیز تکمیل یادآمد تغذیه‌ای ۲۴ ساعته، پرسشنامه فعالیت بدنی و سبک زندگی PAR-Q و پرسشنامه سلامتی PARmed-X [۱۷] (با توجه به معیارهای ورود و خروج به طرح)، در جلسه هماهنگی شرکت کردند و از بین داوطلبین؛ با درنظرگرفتن حجم نمونه انتخاب‌شده در مطالعات قبلی [۱۸،۱۲]، تعداد ۲۴ نفر انتخاب شدند. در ادامه، آزمودنی‌ها رضایت‌نامه مشارکت آگاهانه در طرح پژوهشی را مطالعه و در حضور شاهد امضا کردند. گفتنی است سلامت عمومی آزمودنی‌ها برای شروع همکاری در طرح پژوهشی و نیز حین انجام فعالیت‌های تمرینی توسط یک پزشک مجرب تأیید و پایش گردید. ویژگی‌های فردی و پیکرسنجی نظیر سن، قد، وزن بدن، درصد چربی و شاخص توده بدنی (BMI) آزمودنی‌ها اندازه‌گیری شد و میزان هزینه انرژی روزانه (TDEE) به‌شیوه چندعاملی براساس فرمول TDEE = RMR + TEF + EAT + NEAT [۱۷] محاسبه شد تا براساس آن رژیم غذایی هر یک از آزمودنی اصلاح شود و در ادامه با توجه به $\dot{V}O_2max$ آزمودنی‌ها که با استفاده از آزمون بروس بر روی نوار گردان [۱۷] محاسبه گردید (معادله شماره ۱) و همچنین شاخص‌های درصد چربی (با استفاده از دستگاه Inbody ساخت کره جنوبی مدل ۷۲۱) و مقدار BMI، آزمودنی‌ها در دو گروه همگن تمرین HIIT و کنترل جایگزین شدند. گفتنی است در طی اجرای دوره تمرینی دو نفر از گروه تمرین و یک نفر از گروه کنترل به‌دلیل عدم تمایل به همکاری از مطالعه کنار گذاشته شدند. در شروع و ۴۸ ساعت قبل از شروع دوره تمرینی نمونه‌های خونی ناشتا به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های miR-16، NO، TAC و MDA خون استراحتی، از آزمودنی‌ها اخذ گردید و در ادامه هشت هفته تمرین HIIT (در سالن تمرینی مناسب از نظر داشتن تهویه مناسب، محلول‌های ضدعفونی‌کننده دست و تجهیزات ورزشی (و سرویس بهداشتی) و با بررسی دریافت دو دوز واکسن کووید-۱۹ و در زمان‌های اختصاصی) اجرا شد. همچنین، ۴۸ ساعت بعد از اتمام آخرین جلسه تمرینی اخذ نمونه‌های خونی تکرار شد. آزمودنی‌ها به‌منظور کسب آمادگی ابتدایی برای شرکت در دوره برنامه تمرینی HIIT، به‌مدت دو هفته به انجام تمرینات هوازی با شدت ۶۵-۵۵ درصد ضربان قلب ذخیره یا کاروونن (با استفاده از معادله شماره ۲) پرداختند [۱۷] و متعاقب آشنایی و کسب آمادگی، قرارداد ورزشی هشت هفته‌ای به‌صورت سه جلسه تمرینی در چهار هفته اوّل سه جلسه و چهار جلسه تمرینی در چهار هفته دوم اجرا شد. آزمودنی‌ها در هر جلسه تمرینی، پس از ۱۰ دقیقه گرم کردن و انجام تمرینات کششی، پنج حرکت اصلی منتخب این برنامه تمرینی شامل زانوبلند، پروانه، بورپی، کتل بل‌اسنچ و اسکات گابلت را پنج دست به‌صورت دایره‌ای و هر کدام به‌مدت ۱۵ ثانیه انجام دادند [۲۰،۱۹،۱۷]. نظر به این‌که رسیدن به ضربان قلب تعیین‌شده هدف اصلی بود، بنابراین آزمودنی‌ها تشویق می‌شدند تا حرکات را به‌صورت مداوم و تا حدّ امکان سریع انجام بدهند تا به ضربان قلب تعیین‌شده دست یابند [۲۱،۱۷]. جزئیات برنامه تمرین ورزشی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

معادله ۱:

اکسیژن مصرفی بیشینه = [۱۴/۸] – [۱/۳۷۹(زمان)^{۱}] + [۰/۴۵۱(زمان)^{۲}] – [۰/۰۱۲(زمان)^{۳}]

معادله ۲:

ضربان قلب کاروونن ٪ = [ضربان قلب استراحتی – ضربان قلب بیشینه) ٪] + ضربان قلب استراحتی

جدول شماره ۲- مشخصات و زمان‌بندی برنامه تمرینات تناوبی با شدت بالا

هفته	مدت هر حرکت	استراحت بین حرکات	تعداد ست	استراحت بین ست	شدت	نسبت کار به استراحت	تعداد جلسات هفتگی
۱	۱۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۵	۲ دقیقه	۸۰٪	۱ به ۳	۳
۲	۱۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۵	۲ دقیقه	۸۰٪	۱ به ۳	۳
۳	۱۵ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵	۲ دقیقه	۸۰٪	۱ به ۲	۳
۴	۱۵ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵	۲ دقیقه	۸۰٪	۱ به ۲	۳
۵	۱۵ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵	۲ دقیقه	۸۵٪	۱ به ۲	۴
۶	۱۵ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵	۲ دقیقه	۸۵٪	۱ به ۲	۴
۷	۱۵ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵	۱ دقیقه	۹۰٪	۱ به ۲	۴
۸	۱۵ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵	۱ دقیقه	۹۰٪	۱ به ۲	۴

نمونه‌های خونی توسط پرستار مجرب به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از ورید پیش‌آرنجی دست چپ آزمودنی‌ها در دو مرحله یعنی ۴۸ ساعت قبل از شروع دوره تمرینی و همچنین ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی تهیه شد و به لوله‌های ویژه جداسازی سرم اضافه شد و بلافاصله در محلّ دریافت نمونه سانتریفیوژ گردید و سرم به‌دست‌آمده به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد و در اسرع وقت برای اندازه‌گیری‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری TAC سرمی، مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده با اندازه‌گیری در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر به‌طور اسپکتروفتومتری با استفاده از کیت شرکت Randox (nx2332randox kit) انگلیس با حساسیت ۰/۱ mM (CV=۲/۷) و به روش میلر انجام گرفت [۲۲]. مالون دی‌آلدهید سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA)، استخراج با بوتانل طبیعی، اندازه‌گیری جذب در طول موج ۵۳۲ nm با روش اسپکتروفتومتری و در نهایت مقایسه جذب با منحنی استاندارد انجام شد. اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید نیز با استفاده از کیت‌های سنجش نیتریک‌اکساید $Natrix^{TM}$ ساخت شرکت نوند سلامت ایران در جذب نوری ۵۲۰ تا ۵۹۰ nm انجام شد. به‌منظور اندازه‌گیری miR-16 نیز مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA و بیان ژن دنبال شد. استخراج RNA: به‌منظور استخراج RNA کل از معرفTripure isolation reagent ساخت شرکت Roche آلمان (Roche, Cat No.11667165001) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به‌منظور تعیین کیفیت و کمّیت RNAهای استخراج‌شده، از دستگاه Nano Drop (NanoDrop ND-2000C, Thermo Fisher Scientific) ساخت شرکت Thermo ایالات متحده امریکا استفاده شد و تا زمان سنتز cDNAدر دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سنتز cDNA و ارزیابی بیان microRNA به‌روش Real- time PCR: در ادامه بعد از مشخص‌شدن غلظت و خلوص RNAهای استخراج‌شده، miRNA با استفاده از روش stem-loop مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA شرکت سازنده (TAKARA Cat No. 6130) به cDNA تبدیل شد. تجزیه‌وتحلیل میزان بیان (سنجش میزان miRNA) طی واکنش Real-time PCR به‌وسیله light cycler 96 ساخت شرکت Roche آلمان به‌همراه توالی پرایمر اختصاصی miR-16 انجام شد. توالی پرایمرهای اختصاصی در جدول شماره ۳ آورده شده است. درنهایت از سطح رونوشت ژن مرجع miR-U6 برای استانداردسازی سطح بیان ژن هدف استفاده شد. در ادامه، براساس داده‌های به‌دست‌آمده از واکنش Real- time PCR و شناسایی میزان Ct مربوط به ژن هدف (miR-16) و ژن کنترل داخلی، میزان دلتا Ct (Ct کنترل – Ct هدف = ΔCt) به‌دست‌آمده تغییرات بیان (fold change) براساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد [۲۳].

جدول شماره ۳- توالی پرایمرها در Real- time PCR

Primer (Genes)	Sequence 5'→ 3' (10-50 bp)	Length
Mir -16 stem	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAcgccaa	49
Mir -16 forward	CGTGCTCATagcagcacgT	19

مقادیر TAC، MDA، NO سرمی و همچنین داده‌های نهایی به‌دست‌آمده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد تجزیه‌وتحلیل شد و وضعیت طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک تعیین گردید ($P>۰/۰۵$). سپس به‌منظور بررسی تغییرات درون‌گروهی و بین‌گروهی در شاخص‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب از آزمون‌های تی همبسته و تی مستقل در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۵ صورت گرفت. به‌منظور ترسیم نمودارهای موردنیاز نیز از نرم‌افزار Excel مایکروسافت آفیس نسخه ۲۰۱۶ استفاده شد.

نتایج

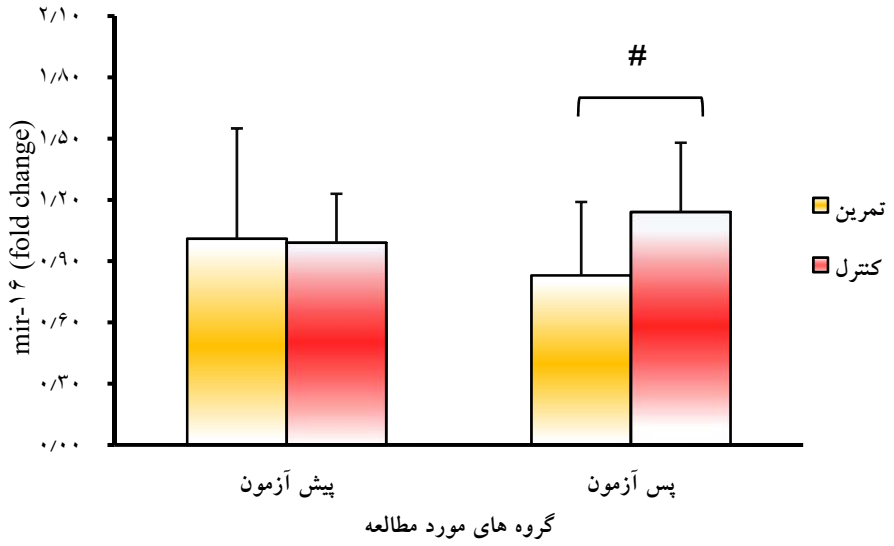
در جدول شماره ۱ مشخصات فردی و آنتروپومتریکی آزمودنی‌ها و در جدول شماره ۴ مقادیر متغیرهای وابسته در هر دو گروه تمرین و کنترل ارائه گردیده است. نتایج مربوط به مقایسه میانگین پیش‌آزمون تمامی شاخص‌ها با استفاده از آزمون تی مستقل، نشان داد که پیش از شروع طرح تحقیق، تفاوت معنی‌داری بین هیچ‌کدام از متغیرهای تحقیق وجود ندارد ($P>۰/۰۵$).

جدول شماره ۴- مقادیر نیترات، MDA، TAC و miR-16 قبل و بعد از انجام مداخله تمرینی

شاخص	گروه	پیش‌آزمون $\bar{X} \pm SD$	پس‌آزمون $\bar{X} \pm SD$	درون‌گروهی P	بین‌گروهی P
نیترات (mg/dl)	تمرین	۴/۴۳ ± ۰/۳۲	۵/۳ ± ۰/۸۴	P=۰/۰۱*	P= ۰/۰۲۱#
	کنترل	۴/۵۹ ± ۰/۴۳	۴/۵۱ ± ۰/۴۸	P=۰/۳۲	
miR-16 (میزان بیان)	تمرین	۳۲۱/۶۸ ± ۱۷۲/۳۲	۲۴۶/۵۷ ± ۷۲/۰۸	P=۰/۳۱	P=۰/۰۴۱#
	کنترل	۳۱۳/۹۸ ± ۱۱۶/۵۸	۳۳۷/۱۹ ± ۱۰۲/۶۰	P=۰/۲۴	
MDA (nmol/ml)	تمرین	۲/۲۹ ± ۰/۸	۱/۴۵ ± ۰/۲۹	P=۰/۰۱۷*	P=۰/۰۲۱#
	کنترل	۲/۰۱ ± ۰/۸۴	۲/۲۵ ± ۰/۸۷	P=۰/۷۴	
TAC (mmol/ml)	تمرین	۱/۷۴ ± ۰/۲۳	۲/۱۲ ± ۰/۴۵	P=۰/۰۴۳*	P=۰/۰۱۹#
	کنترل	۱/۶۳ ± ۰/۳۹	۱/۵۴ ± ۰/۵۰	P=۰/۷۳	

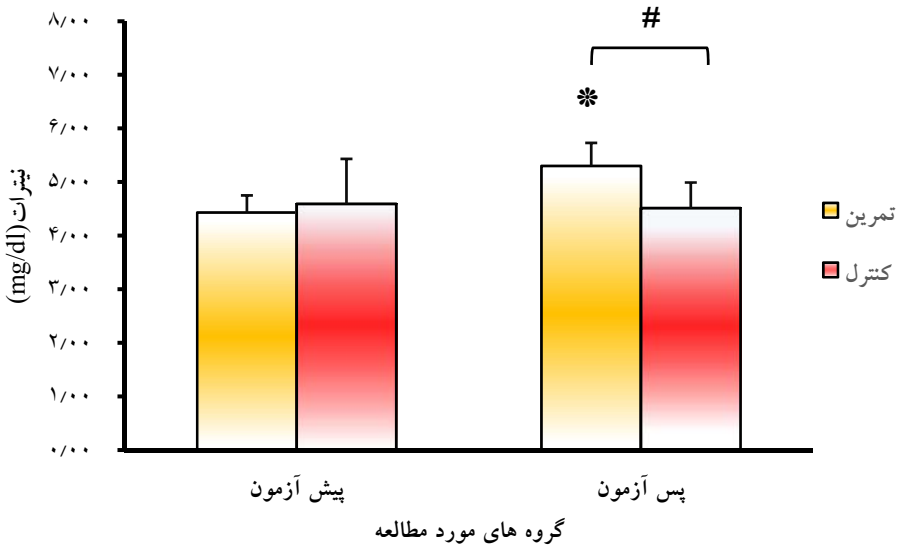
*: معنی‌داری درون‌گروهی #: معنی‌داری بین‌گروهی

نتایج آزمون تی همبسته نشان داد که وزن، درصد چربی و شاخص توده بدنی، حداکثر اکسیژن مصرفی، MDA، TAC و نیترات آزمودنی‌ها در گروه تمرینی پس از هشت هفته تمرین HIIT کاهش معنی‌داری پیدا کرده است (P<۰/۰۵). همچنین براساس نتایج آزمون تی مستقل بین مقادیر درصد چربی، MDA، TAC، miR-16 و نیترات در گروه کنترل و تمرینی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد که در جدول شماره ۴ و شکل‌های شماره‌های ۱ تا ۴ نشان داده شده است.



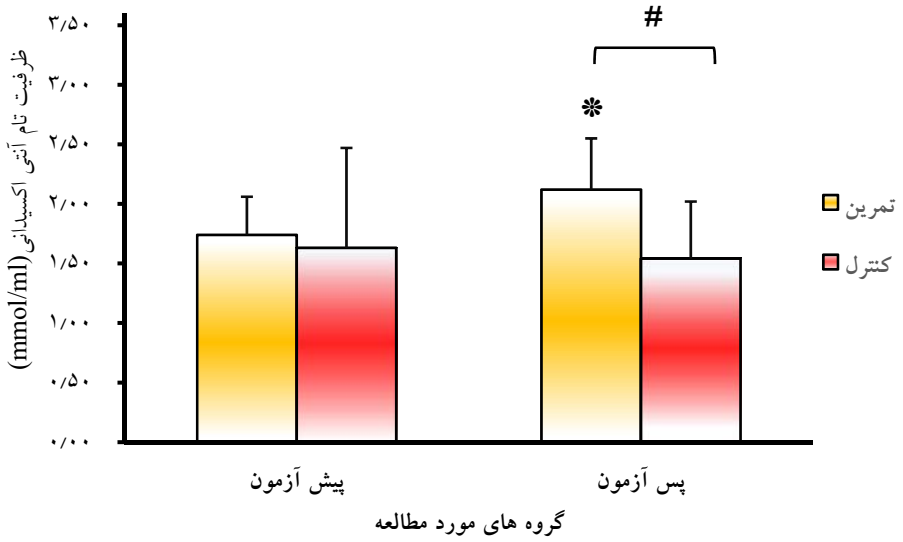
شکل شماره ۱- میزان تغییرات غلظت miR-16 سرمی در گروه‌های مورد مطالعه

*: معنی‌داری درون‌گروهی #: معنی‌داری بین‌گروهی



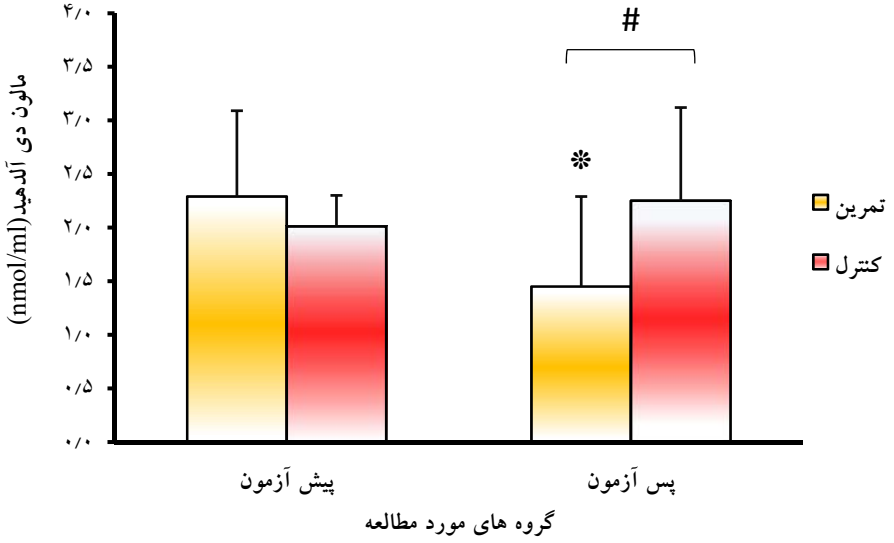
شکل شماره ۲- میزان تغییرات نیترات سرمی در گروه‌های مورد مطالعه

*: معنی‌داری درون‌گروهی # معنی‌داری بین‌گروهی



شکل شماره ۳- میزان تغییرات ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرمی در گروه‌های مورد مطالعه

*: معنی‌داری درون‌گروهی # معنی‌داری بین‌گروهی



شکل شماره ۴- میزان تغییرات غلظت مالون دی‌آلدهید سرمی در گروه‌های مورد مطالعه

*: معنی‌داری درون‌گروهی # معنی‌داری بین‌گروهی

بحث

هدف این تحقیق بررسی اثر تمرین HIIT بر برخی از شاخص‌های استرس اکسایشی و miRNA منتخب مرتبط با عملکرد اندوتلیالی مردان چاق بود و نظر به جستجوهای انجام‌شده در نشریات معتبر مطالعه حاضر اوّلین مطالعه پژوهشی در زمینه بررسی ارتباط miR-16 و عملکرد اندوتلیالی در مردان چاق متعاقب انجام یک دوره تمرینات HIIT است. در مطالعه حاضر تمرینات HIIT باعث کاهش مقادیر miR-16 شد که با نتایج Fernandes و همکاران (۲۰۱۸) همسو است [۱۵]. گروه پژوهشی Fernandes به‌دنبال ۱۰ هفته تمرین هوازی شنا در موش‌های چاق نشان دادند که تمرینات هوازی موجب تنظیم کاهشی miR-16 و معکوس‌سازی کاهش عروق ریز می‌شود [۱۵]. در مقابل، پاشایی و همکاران (۲۰۲۱) نیز در مطالعه‌ای ناهمسو، افزایش بیان miR-16 را به‌عنوان یک عامل اپی‌ژنتیکی ضدالتهابی در زنان چاق به‌دنبال ۸ هفته تمرین HIIT گزارش کردند [۱۶]. به‌طورکلی، هنگام چاقی این miRNA افزایش می‌یابد و کاهش سطوح آن با افزایش بیان eNOS mRNA همراه است که درنهایت به افزایش سطوح NO و بهبود عملکرد اندوتلیالی منجر می‌شود [۷،۲]. با این‌حال، تحریکات و واکنش‌های مولکولی متفاوت مرتبط با فعالیت‌های ورزشی مبهم بوده [۲۴،۱۵]، نظر به این‌که مطالعات بسیار اندکی در این‌زمینه صورت گرفته است، نتایج می‌بایست کاملاً با احتیاط تفسیر گردد و مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است. چاقی باعث ایجاد چندین تنش سلولی از جمله استرس اکسایشی می‌شود [۲]. طبق مطالعه Gao و همکاران (۲۰۲۱)، التهاب مزمن یکی از دلایل مهمّ استرس اکسایشی در چاقی است. در واقع سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین ۶ (IL-6) که از ماکروفاژهای فعال M1 در بافت چربی تولید می‌شوند، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در افراد چاق افزایش می‌دهند [۷]. گزارش شده است که کاهش miR-16 نیز با کاهش میزان التهاب همراه بوده است [۲]. در مطالعه حاضر مقادیر miR-16 و درصد چربی آزمودنی‌ها کاهش یافت که هر دو مورد اشاره‌شده با کاهش التهاب ناشی از چاقی و در نتیجه کاهش استرس اکسایشی (کاهش مقادیر MDA و افزایش TAC) و بهبود عملکرد اندوتلیالی همراه است که با نتایج Zhou و همکاران (۲۰۲۱) همسو است [۴]. علیرغم این‌که رادیکال‌های آزاد تولیدشده می‌توانند زمینه‌ساز بروز آسیب سلولی باشند، اما در مقابل، نقش بسیار مهمّی در سیگنالینگ سلولی و تحریک آنزیمی نیز دارند. مشخص شده است که فعالیت و تمرینات ورزشی مداخله غیردارویی برای وضعیت‌های پاتولوژیکی گوناگونی است [۲۶،۲۵]. بنیان‌های فعال اکسیژنی که در طی فعالیت‌های ورزشی آزاد می‌شوند، می‌توانند با فعال کردن مسیر سیگنالینگ مهمّی نظیر میتوژن محرک پروتئین کیناز (MAPK)، رونویسی عوامل مختلفی را سبب شده، درنهایت به بهبود استرس اکسایشی منجر گردد. به‌عبارتی می‌تواند از بروز اختلالات و بیماری‌های استرس اکسایشی وابسته به چاقی نظیر بیماری‌های قلبی - عروقی و دیابت جلوگیری نماید [۲۷]. در رابطه با بیان miRNAها، مطالعات پژوهشی گزارش کرده‌اند که تمرینات ورزشی، فرآیندهای اپی‌ژنتیکی به‌ویژه

متیلاسیون DNA و بیان miRNA را تغییر می‌دهند. به‌طوری‌که نشان داده شده است که لاکتات تولیدی از تمرینات HIIT می‌تواند هم در بافت عضلانی و هم در سایر بافت‌های بدن، با اثرگذاری بر متیلاسیون DNA و بیان miRNA، تأثیرات اپی‌ژنتیکی خود را بر جای بگذارد [۲۸]. علاوه‌بر این، شواهد جدید پژوهشی نشان می‌دهد که miRNAها می‌توانند توسط ROS تنظیم شوند. به‌طوری‌که یک تعامل تنظیمی بین miRNAها و سیگنالینگ ردوکس وجود دارد و در واقع، ROS به نحوه چشمگیری بر رونویسی، بیوژنز و عملکرد miRNA تأثیر می‌گذارد. بنابراین، تغییرات ایجادشده در ردوکس سلولی ناشی از فعالیت ورزشی می‌توانند بر سطوح miRNA تأثیر بگذارند [۲۴]. سازوکار دیگری که در تنظیم میزان NO در هنگام چاقی می‌تواند دخیل باشد، کاوئولین-۱ غشای سلولی (CAV1) است. این پروتئین تنظیم‌کننده منفی فعالیت eNOS بوده که در اثر چاقی دچار تنظیم افزایشی می‌شود و باعث افزایش سطح سرامید شده که به عنوان مختل‌کننده مسیر eNOS/Akt/HSP 90 است [۲۹]. علاوه‌بر آن، مسیر پیام‌رسانی دیگری که در کاهش NO تولیدشده ناشی از چاقی (توسط eNOS) به‌طور قابل‌توجهی پشتیبانی می‌شود، افزایش میزان بیان یا میزان فعالیت آرژیناز (Arginase) است [۳۰]. آرژیناز آنزیمی است که با eNOS برای سوبسترای مشترک آن‌ها (ال‌آرژنین) رقابت می‌کند. کاهش دردسترس‌بودن ال‌آرژنین نیز به کاهش تولید NO منجر می‌شود [۳۰]. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، درصد چربی آزمودنی‌ها در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در واقع با توجه به نتایج تحقیق حاضر، می‌توان استنباط کرد که تمرینات ورزشی HIIT به‌عنوان بخش مهمّی از سبک زندگی سالم و یک استراتژی مهمّ غیردارویی، باعث کاهش چاقی و معکوس‌شدن سازوکارهای اشاره‌شده گردیده، به افزایش مقادیر NO و بهبود عملکرد اندوتلیالی منجر شده است که با نتایج Meziat و همکاران (۲۰۱۹) همسو است که گزارش کردند تمرینات ورزشی باعث کاهش مقادیر چاقی و در نتیجه افزایش مقادیر eNOS در موش‌های چاق می‌شود [۳۱]. پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند که افزایش تنش برشی ناشی از تمرینات HIIT بیشتر از تمرینات تداومی است که eNOS را فعال می‌کند، تولید NO را افزایش داده، عملکرد اندوتلیال را بهبود می‌بخشد [۳۲]. در واقع مشخص شده است که در تمرینات ورزشی انواع مختلفی از فاکتورهای رشد در گردش خون ترشح می‌شوند که عبارتند از فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF1)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF). در پاسخ به فعالیت ورزشی، IGF1، گیرنده IGF1 (IGF1R) و سوبسترای گیرنده انسولین (IRS) قادر به فعال کردن مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT است که نقش کلیدی در حفظ عملکرد بهینه عروق دارد [۷]. فاکتور رشد شبه‌انسولین (IGF1) پس از اتصال به IGF1R، متعاقباً به IRS1/IRS2 متصل می‌شود که سیگنالینگ PI3K-AKT را فعال می‌کند و فسفوریلاسیون eNOS را به‌واسطه AKT و در نتیجه تولید NO را افزایش می‌دهد [۳۳،۷]. از طرفی دیگر، اخیراً یک تنظیم‌کننده مهمّ سوخت‌وسازی به‌نام پروتئین‌کیناز فعال‌شده با AMP (AMPK)، به یکی از کانون‌های تحقیقاتی تبدیل شده است. AMPK می‌تواند چندین سوبسترا را فسفریله کرده، در هومئوستاز انرژی و تنظیم سوخت‌وساز شرکت کند [۷،۲]. مطابق مطالعات AMPK اندوتلیالی (eAMPK) نقش مهمّی در تنظیم جریان خون، واسطه‌سازی پاسخ هیپرپلاریزه مشتق از اندوتلیوم و تنظیم فشار خون ایفا می‌کند [۳۳،۷،۲]. مشخص شده است که AMPK در اثر تمرینات ورزشی دچار تنظیم افزایشی شده، متعاقباً فعالیت گیرنده δ فعال‌کننده تکثیر پراکسی‌زوم (PPARδ) را افزایش می‌دهد [۳۳،۷]. AMPK/PPARδ به‌طور هم‌افزایی استرس شبکه آندوپلاسمی (ER) و استرس اکسایشی ناشی از چاقی را کاهش داده، به محافظت ناشی از فعالیت ورزشی از اندوتلیوم عروقی کمک می‌کند [۷،۲]. در مطالعه حاضر نیز مقادیر NO در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل افزایش داشت که بخشی از این افزایش با سازوکار ذکرشده در بالا قابل‌توجیه است و با مطالعه Jo و همکاران (۲۰۲۰) همسو است که به مقایسه تأثیر تمرینات HIIT با تمرینات تداومی بر عملکرد اندوتلیالی افراد مبتلا به سندرم متابولیک پرداختند و گزارش نمودند که تمرینات HIIT، مقادیر نیتریک‌اکساید را بیشتر از گروه تمرینی تداومی بهبود می‌بخشد [۳۳].

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی تمرینات HIIT با کاهش مقادیر miR-16، افزایش تنش برشی و کاهش استرس اکسایشی ناشی از چاقی، باعث افزایش مقادیر NO شده، در نهایت عملکرد اندوتلیالی را بهبود می‌بخشد. با این‌وجود نظر به این‌که مطالعات بسیاری محدودی در این‌زمینه پژوهشی انجام شده است، پژوهش‌های آتی می‌تواند ابعاد جدیدی از سازوکارهای مؤثر در این شیوه از تمرینات را آشکار سازد.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در اجرای این طرح یاری‌رسان بودند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

[1] Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. ***Metabolism*** 2019; 1(92): 6-10.
[2] Ait-Aissa K, Nguyen QM, Gabani M, Kassan A, Kumar S, Choi SK et al. MicroRNAs and obesity-induced endothelial dysfunction: key paradigms in molecular therapy. ***Cardiovasc Diabetol*** 2020; 19(1): 1-26.
[3] Martínez-Martínez E, Cachofeiro V. Oxidative stress in obesity. ***Antioxidants*** 2022; 11(4): 1-3.
[4] Zhou Y, Li H, Xia N. The interplay between adipose tissue and vasculature: Role of oxidative stress in obesity. ***Front Cardiovasc Med*** 2021; 8(131): 1-14.
[5] Ortiz-Dosal A, Rodil-García P, Salazar-Olivo LA. Circulating microRNAs in human obesity: a systematic review. ***Biomarkers*** 2019; 24(6):499-509.
[6] Ji C, Guo X. The clinical potential of circulating microRNAs in obesity. ***Nat Rev Endocrinol*** 2019; 15(12): 731-43.
[7] Gao J, Pan X, Li G, Chatterjee E, Xiao J. Physical exercise protects against endothelial dysfunction in cardiovascular and metabolic diseases. ***J Cardiovasc Transl Res*** 2022; 15(3): 604-20.
[8] Lee Y, Im E. Regulation of miRNAs by natural antioxidants in cardiovascular diseases: Focus on SIRT1 and eNOS. ***Antioxidants*** 2021; 10(3): 2-29.
[9] Schmitz B, Niehues H, Lenders M, Thorwesten L, Klose A, Krüger M et al. Effects of high-intensity interval training on microvascular glycocalyx and associated microRNAs. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 2019; 316(6): H1538-51.
[10] Laursen P, Buchheit M. Science and application of high-intensity interval training. 1st ed. Human Kinetics; 2019.
[11] Sultana RN, Sabag A, Keating SE, Johnson NA. The effect of low-volume high-intensity interval training on body composition and cardiorespiratory fitness: a systematic review and meta-analysis. ***Sports Med*** 2019; 49(11): 1687-721.
[12] Tsirigkakis S, Mastorakos G, Koutedakis Y, Mougios V, Nevill AM, Pafili Z, et al. Effects of two workload-matched high-intensity interval training protocols on regional body composition and fat oxidation in obese men. ***Nutrients*** 2021; 13(4): 1-15.
[13] Izadi MR, Ghardashi Afoosi A, akbari N, babaee bigi MA. The effect of high intensity interval training on cardio-respiratory fitness levels, endothelin-1 and Nitric oxide levels in obese individuals. ***J Jiroft Univ Med Sci*** 2022; 8(4):789-98. [in Persian]
[14] Attarzadeh Hosseini SR, Moazzami M, Farahati S, Bahremand M, Sadegh Eghbali F. Effects of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on the total antioxidant capacity, malondialdehyde, and superoxide dismutase in obese/overweight middle-aged women. ***Iran J Endocrinol Metab*** 2020; 22(3): 207-13. [in Persian]
[15] Fernandes T, Casaes L, Soci U, Silveira A, Gomes J, Barretti D, et al. Exercise training restores the cardiac microrna-16 levels preventing microvascular rarefaction in obese Zucker rats. ***Obes Facts*** 2018; 11(1): 15-24.
[16] Pashaei Zh, Jafari A, Alivand MR. The effect of 8 weeks High- intensity interval training and combined training on miR-16 expression in peripheral mononuclear blood cells of overweight/obese middle-aged women. ***Med J Tabriz Uni Med Sci Health Serv*** 2020; 42(6): 745-55. [in Persian]
[17] Gibson AL, Wagner D, Heyward V. Advanced fitness assessment and exercise prescription. 8th ed. Human kinetics; 2019.
[18] Khammassi M, Ouerghi N, Hadj-Taieb S, Feki M, Thivel D, Bouassida A. Impact of a 12-week high-intensity interval training without caloric restriction on body composition and lipid profile in sedentary healthy overweight/obese youth. ***J Exerc Rehabil*** 2018; 14(1): 118-25.
[19] Bompa TO, Buzzichelli C. Periodization: theory and methodology of training. 6th ed. Human kinetics; 2019.
[20] Bompa T, Buzzichelli C. Periodization training for sports. 3th ed. Human kinetics. 2015.
[21] Moghaddam M, Estrada CA, Muddle TW, Magrini MA, Jenkins ND, Jacobson BH. Similar anaerobic and aerobic adaptations after 2 high-intensity interval training configurations: 10: 5s vs. 20:10s work-to-rest ratio. ***J Strength Cond Res*** 2021; 35(6): 1685-92.
[22] Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. ***Clin Sci*** 1993; 84(4): 407-12.
[23] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. ***Nucleic Acids Res*** 2001; 29(9): 2003-7.
[24] Dimauro I, Paronetto MP, Caporossi D. Exercise, redox homeostasis and the epigenetic landscape. ***Redox Biol*** 2020; 35(101477): 1-17.
[25] Surapongchai J, Rattanavichit Y, Buniam J, Saengsirisuwan V. Exercise protects against defective insulin signaling and insulin resistance of glucose transport in skeletal muscle of angiotensin II-infused rat. ***Front Physiol*** 2018; 9(358): 1-13.
[26] Zolfi HR, Sari-Sarraf V, Babaei H, Vatankhah A. The effects of grape seed extract supplementation on exercise-induced oxidative stress in young untrained males. ***Iran J Health Sci*** 2021; 9(4): 46-57.
[27] Bouviere J, Fortunato RS, Dupuy C, Werneck-de-Castro JP, Carvalho DP, Louzada RA. Exercise-stimulated ROS sensitive signaling pathways in skeletal muscle. ***Antioxidants*** 2021; 10(4): 4-21.

[28] Plaza-Diaz J, Izquierdo D, Torres-Martos Á, Baig AT, Aguilera CM, Ruiz-Ojeda FJ. Impact of Physical Activity and Exercise on the Epigenome in Skeletal Muscle and Effects on Systemic Metabolism. ***Biomedicines***. 2022; 10(126): 1-29.
[29] Engin A. Endothelial Dysfunction in Obesity. ***Adv Exp Med Biol*** 2017; 960: 345-79.
[30] Wierzchowska-McNew R, Engelen M, Thaden J, Have GT, Deutz N. Obesity-and sex-related disturbances in arginine and nitric oxide kinetics. ***Curr Dev Nutr*** 2022; 6(1): 1091.
[31] Meziat C, Boulghobra D, Strock E, Battault S, Bornard I, Walther G, et al. Exercise training restores eNOS activation in the perivascular adipose tissue of obese rats: Impact on vascular function. ***Nitric Oxide*** 2019; 86: 63-67.
[32] Edwards J, De Caux A, Donaldson J, Wiles J, O'Driscoll J. Isometric exercise versus high-intensity interval training for the management of blood pressure: a systematic review and meta-analysis. ***Br J Sports Med*** 2022; 56(9): 506-14.
[33] Jo EA, Cho KI, Park JJ, Im DS, Choi JH, Kim BJ. Effects of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on epicardial fat thickness and endothelial function in hypertensive metabolic syndrome. ***Metab Syndr Relat Disord*** 2020; 18(2): 96-102.