مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۶، شهریور ۱۴۰۱ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثر دو شدت مختلف تمرین تناوبی همراه مصرف آلفا لیپوئیک اسید بر بیان ژن MFN بافت قلب موش‌های دارای پرفشارخونی

هادی کرمی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

امین فرزانه حصاری: استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران (* نویسنده مسئول) af.hessari@gmail.com

پروین فرزانگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

چکیده

زمینه و هدف: پرفشارخونی به دلیل ایجاد خطرات قلبی عروقی و بیماری‌های کلیوی، از مهم‌ترین معضلات سلامت عمومی است. هدف از انجام تحقیق حاضر تعیین اثر دو شدت مختلف تمرین تناوبی همراه مصرف آلفا لیپوئیک اسید بر بیان ژن MFN بافت قلب موش‌های دارای پرفشارخونی بود.

روش کار: برای انجام این تحقیق تجربی ۳۵ سر موش نر نژاد ویستار، هشت هفته‌ای و وزن ۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم انتخاب و پس از یک هفته آشنا سازی، ۵ موش به صورت تصادفی به عنوان گروه سالم جدا شده و ۳۰ موش باقیمانده دچار پرفشارخونی شده و به صورت تصادفی در شش گروه: کنترل، تمرین تناوبی متوسط، تمرین تناوبی شدید، مکمل آلفا لیپوئیک اسید، مکمل+ تمرین تناوبی شدید، مکمل+ تمرین تناوبی متوسط تقسیم شدند. برای القای پرفشارخونی، محلول ال نیترو آرژنین متیل استر با دوز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز و به مدت سه هفته بصورت خوراکی استفاده شد. برنامه تمرینی تناوبی با شدت بالا و متوسط به مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته اجرا شد. به منظور مکمل‌دهی، روزانه میزان ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش‌ها مکمل آلفالیپوئیک اسید لیپوزومال در متیل سلولز حل شده و یک ساعت بعد از تمرین بصورت گاواژ به موش‌ها داده شد. بیان ژن mfn2 از روش real-time PCR اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: سطح mfn2 در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم کاهش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۱۸). آلفالیپوئیک اسید (P=۰/۰۰۸) و تمرین تناوبی شدید+آلفالیپوئیک اسید (P=۰/۰۱۴) و تمرین تناوبی شدید+آلفالیپوئیک اسید (P=۰/۰۳۹) سطح mfn2 را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دیابت افزایش دادند.

نتیجه‌گیری: فشارخون با کاهش بیان ژن mfn2 بافت قلب همراه است و تمرین تناوبی به همراه مکمل آلفالیپوئیک اسید احتمالاً مداخله مؤثر در افزایش mfn2 بافت قلب در فشارخون در نظر گرفته می‌شود.

کلیدواژه‌ها

تمرین ورزشی،
آلفا لیپوئیک اسید،
پویایی میتوکندریایی،
پرفشارخونی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴
تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۶/۰۵

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Karami H, Farzaneh Hesari A, Farzanegi P. The Effect of Two Different Intensities of Interval Training with Alpha Lipoic Acid Consumption on the Expression of mfn Gene in Heart Tissue of Rats with Hypertension. Razi J Med Sci. 2022;29(6):188-198.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;29(6):188-198. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

The Effect of Two Different Intensities of Interval Training with Alpha Lipoic Acid Consumption on the Expression of mfn Gene in Heart Tissue of Rats with Hypertension

Hadi Karami: PhD Student, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
Amin Farzaneh Hesari: Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran (* Corresponding author) af.hessari@gmail.com
Parvin Farzanegi: Associate professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background & Aims: Hypertension is a chronic disease that affects approximately 1 billion people worldwide and is estimated to continue to increase. High blood pressure causes long-term damage to the heart and other organs that may be potentially life-threatening and often begins at the cellular and subcellular levels (1). Despite the greater understanding of the pathological processes of hypertension and the use of various drug interventions in recent years, the mortality rate of this disease is still high. Therefore, new intervention strategies are needed to prevent and control pathological changes to improve high blood pressure disease. In this regard, exercise training can reduce blood pressure in hypertensive individuals and it has been shown to improve several factors involved in the pathophysiology of hypertension (9). For a long time, continuous exercise for a period of 30 minutes or more has been recommended to improve patients with high blood pressure and also to prevent this disease. However, recent studies have suggested that HIIT exercises may compete with new blood pressure treatments. Some studies have shown that HIIT has a higher priority for improving cardiovascular fitness, endothelial function, markers of sympathetic activity, arterial stiffness, lipoproteins and blood glucose in people with hypertension (10). It has also been shown that HIT leads to adaptations similar to traditional endurance training, such as increasing mitochondrial capacity and improving endurance performance (10).
In addition to exercise intervention, the effect of nutritional interventions in controlling blood pressure has attracted much attention. In this regard, the consumption of antioxidants can play a significant role. Alpha lipoic acid (ALA) supplement is a strong antioxidant and acts as a cofactor in the mitochondrial dehydrogenase enzyme complex in metabolism (14). Alpha-lipoic acid is a powerful antioxidant. This substance exerts its antioxidant effect by directly clearing free radicals and chelating metal ions, as well as affecting other antioxidants and increasing intracellular glutathione (15). Alpha-lipoic acid and dehydro-alpha-lipoic acid reduce oxidative damage by their cooperative action and through the activation of the antioxidant system and the regeneration of endogenous antioxidants (16). Therefore, the researcher is trying to discover the question of whether there is a difference between the effect of two different intensities of interval training with alpha lipoic acid consumption on mfn2 gene expression in the heart tissue of rats with hypertension?
Methods: To carry out this experimental research, 35 eight-week-old male Wistar rats weighing 190 to 220 grams were selected and after one week of familiarization, 5 rats were randomly separated as the healthy group and the remaining 30 rats were hypertensive. They were randomly divided into six groups: control, moderate interval training, intense interval training, alpha lipoic acid supplement, supplement + intense interval training, supplement + moderate interval training. To induce high blood pressure, L-nitroarginine methyl ester solution was used orally at a dose of 40 mg per kilogram of body weight per day for three weeks. High and medium intensity interval training program was implemented for six weeks and five sessions per week. For the purpose of supplementation, 20 mg of liposomal alpha lipoic acid supplement per kilogram of body weight was dissolved in methyl cellulose and

Keywords
Exercise training,
Alpha Lipoic Acid,
Mitochodria dynamic,
Hypertension

Received: 25/06/2022
Published: 27/08/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

given to the rats by gavage one hour after training. Real-time PCR method for the relative expression of mRNA of mfn2 gene were used. At the end, descriptive statistics (mean and standard deviation) and Shapiro-Wilk tests, one-way analysis of variance and Tukey's follow-up at a significance level of $p<0.05$ were used for statistical analysis of the data using SPSS version 23 software. became.

Results: The average weight of the subjects is presented using descriptive statistics. The results showed all the mice are in a certain range, which indicates their homogeneity. The results of the one-way variance test showed a significant difference between the mfn2 gene expression in the heart tissue of different groups ($F=3.821$, $p=0.018$). The results of Tukey's post hoc test showed that the expression of the mfn2 gene in the heart tissue was significantly decreased in the hypertension group compared to the healthy group ($P=0.018$). Compared to the blood pressure group, ALA supplementation ($P=0.008$), moderate exercise+supplement ($P=0.039$) and intense exercise+supplement ($P=0.014$) increased the expression of mfn2 gene in heart tissue. An interesting point is that intense interval training ($P=0.991$) and moderate training ($P=0.916$) led to a non-significant increase compared to the blood pressure group. No significant difference was observed between other groups ($P>0.05$).

Cocclusion: The results of the present study showed that six weeks of intense and moderate intermittent exercise did not change the expression of the mfn2 gene in the heart tissue in hypertensive rats. The exact mechanism of control of mitochondrial regeneration in hypertension is not clear. However, it seems that reactive oxygen species (ROS) play an important regulatory role in this process. Sports activity can lead to the production of mitochondrial ROS, and as a result, the expression of mitochondrial fission and fusion proteins increases. As recent evidence has shown that oxidative stress increases mitochondrial fission. However, it should be noted that apparently the role of ROS in mitochondrial fission depends on the amount and duration of exposure. Based on this, it seems that different intensities of sports activity are associated with different levels of ROS increase and subsequently affect protein fission and fusion. Despite the different effects of sports activity on the production of ROS and antioxidant defense, however, doing bouts and sessions of sports activity in long-term training protocols also leads to a transient increase in ROS, which is probably dependent on the intensity and duration of the sports activity. Based on the findings of the present study, exercise intensity was not a factor affecting the mitochondrial dynamics of heart tissue, so that none of the moderate and high intensity intermittent exercise did not change the indices of mitochondrial dynamics. Few studies have been conducted regarding the effect of training intensities on mitochondrial dynamics. In this regard, Demirchi et al. showed that moderate intensity interval training had a better effect on mitochondrial dynamic indices than intense interval training. It is possible that moderate intensity interval training has led to optimal production of ROS, which has more favorable effects than high and low intensity exercise on mfn2 proteins, so that high intensity interval exercise with an increase in high concentration of ROS leads to a reduction in the effects. Material and exercise as well as intermittent exercise with moderate intensity with much lower levels did not lead to reaching the desired threshold in order to stimulate proteins related to mitochondrial dynamics.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Karami H, Farzaneh Hesari A, Farzanegi P. The Effect of Two Different Intensities of Interval Training with Alpha Lipoic Acid Consumption on the Expression of mfn Gene in Heart Tissue of Rats with Hypertension. Razi J Med Sci. 2022;29(6):188-198.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

مقدمه

فشارخون بالا یک بیماری مزمن است که حدود ۱ میلیارد نفر در سرا سر جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تخمین زده می‌شود که همچنان در حال افزایش باشد. افزایش فشارخون آسیب‌های طولانی مدت به قلب و سایر ارگان‌ها وارد می‌کند که ممکن است به‌طور بالقوه تهدیدکننده زندگی با شند و اغلب در سطوح سلولی و زیر سلولی شروع می‌شود (۱).

عملکرد اصلی میتوکندری تولید انرژی است و در عین حال، بقا و مرگ سلولی (آپوپتوز) را تعدیل می‌کند، تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) برای سیگنالینگ سلولی را تنظیم می‌کند، هموستاز کلسیم داخل سلولی را تعدیل کرده و در ترموژنز شرکت می‌کند (۲). در نتیجه، آسیب و اختلال عملکرد میتوکندری می‌تواند تأثیر عمیقی بر عملکرد کلی سلول بگذارد. میتوکندری‌های میوکارد مستعد اثرات بیماری فشارخون هستند که معمولاً باعث اختلال در ساختار، بیوانرژی یا هموستاز میتوکندریایی می‌شود. تغییرات ساختاری میتوکندری ثانویه به فشارخون بالا ممکن است شامل کاهش جرم و چگالی، تورم و همچنین بازسازی چین غشا داخلی و تکه‌تکه شدن شود (۳).

تغییرات هموستاز میتوکندریایی مشاهده شده در مدل‌های تجربی هایپرتنشن، بر سه فرآیندهای اصلی سلولی: بیوژنز، پویایی و میتوفاژی اثر می گذارد (۴). کاهش تنظیمی پروتئین‌های درگیر در هم‌جوشی میتوکندری و کاهش حجم میتوکندری در این بیماری مشاهده شده است. این دو فرایند مخالف توسط پروتئین‌های همجوشی شامل: OPA1، میتوفیوژن ۱ و MFN1/2 و پروتئین‌های شکافت شامل DRP1 و FIS1 کنترل می شود (۵). به‌طورکلی این دو فرایند همجوشی و شکافت برای عملکرد متابولیسم سلولی ضروری به شمار می‌آیند و جدا سازی میتوکندری‌های آسیب‌دیده یا مختل شده را قبل از آپوپتوز تسهیل می‌کنند (۴) ازاین‌رو، هدف قرار دادن این پروتئین‌ها می‌تواند از آسیب قلبی ناشی از ایسکمی میوکارد جلوگیری کند. همچنین اختلال در عملکرد میتوکندری با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد همراه است به‌طوری‌که اگرچه ایسکمی میوکارد به‌خودی‌خود باعث آسیب بافتی از طریق افزایش اسیدیته، سدیم، کلسیم و تخلیه ATP می شود، رپرفیوژن، این اثرات زیان‌آور را به علت افزایش تولید ROS و جداسازی فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری افزایش می‌دهد (۶).

اگرچه تعداد میتوکندری در سلول های اندوتلیال نسبتاً کم است، اما آن‌ها به‌طورجدی در اختلال عملکرد اندوتلیال که نشانه بارز هایپرتنشن است نقش دارند. افزایش استرس اکسیداتیو منجر به هر دو ناهنجاری‌های میتوکندری و اختلال در عملکرد اندوتلیال می شود (۷). پراکسیداسیون چربی باعث آسیب ساختاری میتوکندریایی در سلول‌های اندوتلیال شریانی می شود که ممکن است منجر به اختلال عملکرد آن‌ها شود. بازسازی عروق مکانیسم مهمی برای تنظیم کالیبر عروقی در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیک است (۸).

علیرغم درک بیشتر فرایندهای پاتولوژیک بیماری فشارخون و استفاده از مداخلات دارویی مختلف در سال‌های اخیر، مرگ و میر ناشی از این بیماری همچنان بالا است؛ بنابراین، استراتژی‌های مداخله‌ای جدید برای جلوگیری و کنترل تغییرات پاتولوژیکی برای بهبود بیماری پر فشارخونی مورد نیاز می‌با شد. در این رابطه، تمرین ورزشی می‌تواند باعث کاهش فشارخون در افراد پرفشارخون شود و نشان داده شده است که چندین عامل درگیر در پاتوفیزیولوژی پرفشارخونی را نیز بهبود می‌بخشد (۹). مدت‌هاست که تمرین مداوم برای مدت زمان ۳۰ دقیقه یا بیشتر برای بهبود بیماران مبتلا به فشارخون و نیز برای جلوگیری از ابتلا به این بیماری توصیه شده است. این در حالیست که در مطالعات اخیر گفته شده است که تمرینات HIIT ممکن است با روش‌های جدید درمان فشارخون رقابت کند. برخی مطالعات نشان داده‌اند HIIT از اولویت بیشتری برای بهبود آمادگی قلبی عروقی، عملکرد اندوتلیال، مارکرهای فعالیت سمپاتیکی، سختی سرخرگی، لیپوپروتئین‌ها و گلوکز خون در افراد مبتلا به فشارخون برخوردار می‌باشد (۱۰). همچنین نشان داده شده است که HIT سازگاری‌هایی همانند تمرین استقامتی سنتی از قبیل افزایش ظرفیت میتوکندریایی و بهبود عملکرد استقامتی را در پی دارد (۱۰). همچنین به نظر می‌رسد ROS نقش تنظیم‌کنندگی مهمی در این فرایند داشته باشند. ROS میتوکندریایی ناشی از فعالیت ورزشی می‌تواند به تغییر سریع در بیان پروتئین‌های همجوشی و شکافت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

میتوکندریایی منجر شود (۱۱). به‌طوری‌که شواهد اخیر نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو منجر به شکافت میتوکندریایی می‌شود. بااین‌حال باید توجه داشت که به نظر می‌رسد، نقش ROS در شکافت میتوکندری و تبدیل به واحدهای متلاشی شده وابسته به غلظت و مدت زمان مواجه با آن باشد. بر این اساس، به نظر می‌رسد، تمرین ورزشی وابسته به شدت فعالیت می‌تواند منجر به افزایش سطوح متفاوتی از ROS شود (۱۲) و به دنبال آن پروتئین شکافت و همجوشی را تحت تأثیر قرار دهد. اگرچه آثار فعالیت ورزشی با تمرینات ورزشی در تولید ROS و همچنین دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند متفاوت باشد، بااین‌حال، اجرای وهله‌ها و جلسات فعالیت ورزشی حتی در پروتکل‌های تمرینی طولانی مدت نیز منجر به افزایش گذرا در ROS در الگویی وابسته به شدت و مدت فعالیت ورزشی می‌شود. بر اساس نتایج تحقیقات صورت گرفته به نظر می‌رسد تمرین تناوبی با شدت متوسط منجر به تولید بهینه از ROS شده است که آثار مطلوب‌تر نسبت به تمرین با شدت بالا و پایین بر پروتئین‌های MFN2 و DRP1 داشته است، به‌طوری‌که تمرین تناوبی با شدت بالا با افزایش غلظت بالایی از ROS منجر به کاهش اثرات مطلب و تمرین و نیز تمرین تناوبی با شدت متوسط با سطوح بسیار کمتر منجر به رسیدن به آستانه مورد نظر به منظور تحریک پروتئین های مرتبط با دینامیک میتوکندریایی نشود (۱۳).

علاوه بر مداخله تمرینی، اثر مداخلات تغذیه‌ای در کنترل بیماری فشارخون توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در این رابطه، مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند نقش به‌سزایی داشته باشد. مکمل آلفالیپوئیک اسید (ALA) یک آنتی‌اکسیدان قوی است و به‌عنوان کوفاکتور در کمپلکس آنزیمی دهیدروژناز میتوکندریایی در متابولیسم فعالیت دارد. آلفا- لیپوئیک اسید ترکیبی هشت کربنه با دو عامل تیول است. این ماده کوفاکتور کمپلکس‌های چند آنزیمی است که دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو آلفا کتواسیدها را کاتالیز می‌کنند. (۱۴). آلفا-لیپوئیک اسید جزء آنتی‌اکسیدان‌های قوی محسوب می‌شود. این ماده اثر آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق پاکسازی مستقیم رادیکال‌های آزاد و شلاته کردن یون‌های فلزی و همچنین اثر بر بقیه آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش گلوتاتیون داخل سلولی اعمال می‌کند (۱۵). آلفا-لیپوئیک اسید و دهیدرو آلفا-لیپوئیک اسید با عمل تعاونی خود و از طریق فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی و احیای آنتی‌اکسیدان های اندوژن سبب کاهش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شوند (۱۶). آلفا-لیپوئیک اسید این اسید چرب هشت کربنه دی تیول با ایجاد باند سولفیدی خاصیت اکسیدا سیون و احیاء را دارد. تولید انرژی در بدن از مهم‌ترین نقش‌های آن به عنوان کوفاکتور پنجم کمپلکس آنزیمی پیرووات دهیدروژناز در سیکل کریس به شمار می‌رود. آلفا لیپوئیک اسید با احیا کردن و برگرداندن ویتامین‌های C و E در چرخه و به دنبال افزایش سطح گلوتاتیون سلولی و در نهایت زدودن رادیکال‌های آزاد از یک طرف در تثبیت شبکه آنتی‌اکسیدانی نقش داشته و از طرف دیگر سبب افزایش فعالیت سایر آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود (۱۵).

با توجه به مطالعات انجام شده و به‌منظور تعیین تأثیر شدت تمرین، نیاز است تا مسیرهای سیگنالینگ درگیر در پویایی میتوکندریایی و عملکرد اندوتلیال در بیماری فشارخون بررسی شود. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در درک مکانیسم‌های سلولی که باعث ایجاد یک فنوتیپ سلولی قلبی محافظت کننده سلول‌های میتوکندریایی با هیپرتروفی فیزیولوژیکی و افزایش ظرفیت تکثیر با بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد شود، مؤثر باشد. ازاین‌رو نتایج این تحقیق ممکن است منجر به اهداف درمانی جدید شود. همچنین نتایج حاصله ممکن است استراتژی‌های نوآورانه‌ای برای حفظ عملکرد قلب در پرفشارخونی ایجاد کنند؛ بنابراین محقق در پی کشف این سؤال است که آیا بین اثر دو شدت مختلف تمرین تناوبی همراه مصرف آلفا لیپوئیک اسید بر بیان ژن MFN بافت قلب موش‌های دارای پرفشارخونی تفاوت وجود دارد؟

روش کار

برای انجام تحقیق تجربی حاضر، ۳۵ سر موش نر نژاد ویستار با سن هشت هفته و میانگین وزن ۱۹۰ تا ۲۲۰

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

گرم از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی هیستوژنوتک تهران تکثیر به عنوان نمونه انتخاب شدند. در ابتدا موش‌ها جهت آشنایی و سازگاری با محیط به مدت یک هفته در آزمایشگاه حیوانات نگهداری شدند. سپس هر پنج موش در هر قفس از جنس پلی کربنات (۳۰ × ۱۵ × ۱۵ سانتیمتر) در یک شرایط آب و هوایی کنترل شده (دمای ۲±۲۲ سانتی‌گراد، رطوبت ۵±۵۰ درصد، یک سیکل شب و روز (۱۲:۱۲) و با رژیم غذایی استاندارد و آب مورد نیاز در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. پس از آشنایی موش‌ها با پروتکل تمرینی، ۵ موش به صورت تصادفی به عنوان گروه سالم جدا شده و ۳۰ موش باقیمانده دچار پرفشارخونی شدند و بصورت تصادفی به شش گروه: کنترل، تمرین تناوبی متوسط، تمرین تناوبی شدید، مکمل آلفا لیپوئیک اسید، مکمل+ تمرین تناوبی شدید، مکمل+ تمرین تناوبی متوسط تقسیم شدند.

برای القای پرفشارخونی، از محلول ال نیترو آرژنین متیل استر (L-NAME) (ساخت شرکت سیگما) با دوز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز و به مدت سه هفته بصورت خوراکی استفاده شد. موش‌ها در گروه‌های L-NAME با رژیم غذایی استاندارد تغذیه می‌کردند و L-NAME در آب آشامیدنی آن‌ها ریخته می‌شد، در حالیکه گروه کنترل رژیم استاندارد مشابه داشتند و آب آشامیدنی می‌خوردند. برای اطمینان از القای فشارخون، با استفاده از سیستم سنجش غیر تهاجمی فشارخون جوندگان (شرکت PANLAB اسپانیا) استفاده شد. برای این منظور، قبل از اندازه‌گیری، موش در محفظه مخصوص قرار می‌گرفت و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه استراحت، کاف حلقوی در انتهای دم موش قرار می‌گرفت. کاف بصورت اتوماتیک باد و خالی می‌شد و فشارخون اندازه‌گیری شد (۱۷). لازم به ذکر است که موش‌هایی که به هر دلیلی کشته می‌شدند یا دچار آسیب جدی می‌شدند که قادر به ادامه پروتکل بودند از تحقیق کنار گذاشته شدند.

دو هفته بعد از القای پرفشارخونی، برنامه تمرینی و مکمل‌دهی انجام شد. قبل از شروع پروتکل تمرینی، آزمودنی های گروه های تمرین به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط نوارگردان (مخصوص فعالیت بدنی حیوانات آزمایشگاهی، ساخت ایران)، در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت هشت تا ده متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. سپس، سرعت بیشینه دویدن برای هر موش و به منظور کنترل شدت تمرین تعیین شد. برای این منظور، بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت پایین، رتها شروع به دویدن کردند و سرعت نوارگردان هر دو دقیقه یک بار دو متر بر دقیقه افزایش یافت تا حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند و به واماندگی برسند. سرعت نهایی رت به عنوان سرعت بیشینه جهت محاسبه شدت‌های تمرینی استفاده گردید. سرعت بیشینه موش‌ها بعد از هفته دوم و چهارم ارزیابی و شدت تمرین براساس مقادیر جدید تعیین می‌شد. برنامه تمرینی تناوبی با شدت بالا و تمرین تناوبی با شدت متوسط به مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته اجرا شد. در هر دو پروتکل تمرینی، موش‌ها ابتدا ۵ دقیقه با سرعت کم (۳۰-۴۰ درصد سرعت بیشینه) و با هدف گرم کردن دویدند. هر جلسه تمرینی تناوبی با شدت بالا شامل ۱۰ ست دویدن چهار دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۸۰ در صد سرعت بیشینه و دو دقیقه استراحت فعال (۴۰-۵۰ در صد سرعت بیشینه) بین هر مرحله تمرین بود. پروتکل تمرین تناوبی با شدت متوسط شامل ۱۳ ست دویدن چهار دقیقه‌ای با شدت ۶۵-۶۰ درصد سرعت بیشینه و ۲ دقیقه استراحت فعال (۵۰-۴۰ درصد سرعت بیشینه) بین ست‌ها بود (۱۸).

همچنین به منظور مکمل‌دهی به گروه های مکمل، روزانه میزان ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش‌ها مکمل آلفالیپوئیک اسید لیپوزومال (مکمل آلفالیپولئیک اسید ساخت شرکت Sigma-Aldrich کشور آمریکا) در متیل سلولز حل شده و یک ساعت بعد از تمرین بصورت گاواژ و یک وعده در روز به موش‌ها داده شد (۱۹). برای لیپوزوم کردن از روش آب‌پوشانی لایه نازک استفاده شد، بدین صورت که ابتدا لسیتین فسفولیپید (L-a-a-phosphatidylcholine) در کلروفرم حل شد و محلول اول به دست آمد. سپس کلسترول در کلروفرم حل شد و محلول دوم به دست آمد. در مرحله

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

بعد، دو محلول به ترتیب با نسبت چهار به یک با هم ترکیب شدند. سپس این ترکیب در دستگاه روتاری، در دمای ۵۰ درجه و سرعت ۱۵۰ rmp و تحت خلا تبخیر شد و با تشکیل فیلم نازک لیپیدی، تبخیر حداقل به مدت دو ساعت ادامه یافت. سپس آلفالیپولئیک اسید را در آب مقطر حل کرده و به محلول اضافه کردیم. برای هموژنایز کردن سوسپانسیون و تولید نانو وزیکول‌ها، نمونه‌های بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با همگن ساز اولتراسوند، همگن شدند. سپس سوسپانسیون هموژن شده در مجاورت نیتروژن قرار گرفت و به مدت یک ساعت تحت حرارت انتقال چربی قرار گرفت. سپس محصول تولید شده سانترفیوژ شد و درنهایت یک سوسپانسیون شفاف از نانولیپوزوم‌ها تولید شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

نهایتاً بیان ژن MFn1 با استفاده از تکنیک PCR Real Time بررسی شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، در شرایط استراحت و ناشتا موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلازین (۳-۵ mg/kg) بی‌هوش شدند. سپس، قفسه سینه حیوان شکافته شده و بافت پانکراس موش ها نمونه‌برداری و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک، در نیتروژن مایع نگهداری شد. جهت سنجش بیان ژن مراحل مختلف تکنیک انجام شد.

در انتها از آمار توصیفی (میانگین و انحراف معیار) و آزمون‌های شاپیروویلک، تحلیل واریانس یک راهه و تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ برای تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها استفاده شد.

نهایتاً لازم به ذکر است که طرح تحقیق حاضر موفق به دریافت کد اخلاق به شماره IR.IAU.SARI.REC.1399.124 گردید.

یافته‌ها

با استفاده از آمار توصیفی، میانگین وزن آزمودنی‌ها در جدول ۱ ارائه گردیده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود از نظر ویژگی‌های توصیفی تمام موش‌ها در یک دامنه مشخص قرار دارند که نشان از همگن بودن آن‌ها دارد.

در جدول ۲ توالی پرایمرها ژن MFN2 نشان داده شده است. در این رابطه نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه بین بیان ژن MFN2 بافت قلب گروه‌های مختلف تفاوت معناداری وجود دارد ($f= ۳/۸۲۱$ و $p=۰/۰۱۸$).

جدول ۱- مقادیر وزن و فشارخون گروه‌های مختلف تحقیق

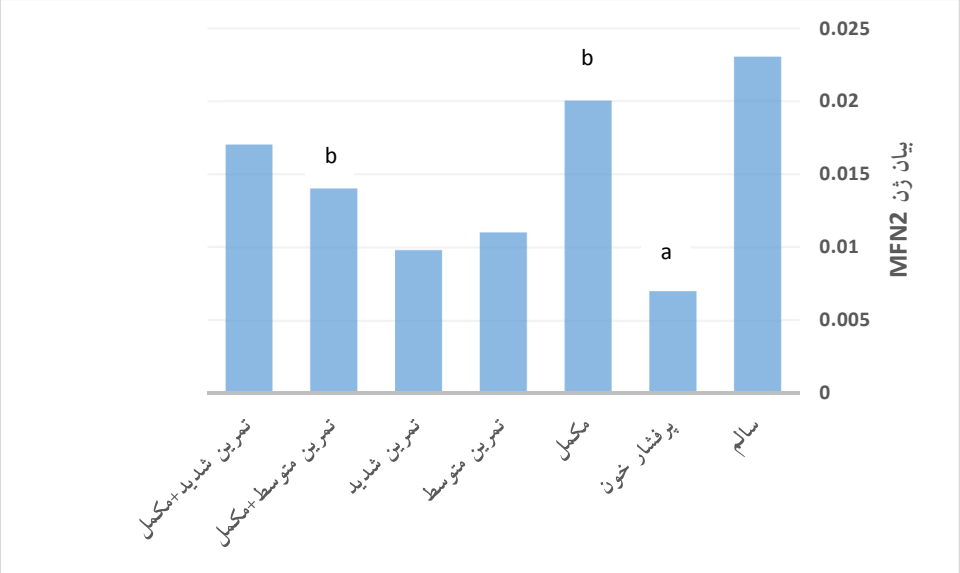
سالم	پرفشارخون	مکمل	تمرین شدید
۲۱۷/۸	۲۲۲/۴	۲۱۸	۲۱۳/۲
۵/۸±	۸/۱۱±	۳/۱۲±	۱/۱۴±
۳۰۰/۴	۲۹۸/۶	۲۹۵/۶	۲۸۳/۴
۷/۱۰±	۶/۲۶±	۳/۲۰±	۱/۴۱±
۸۱/۶	۱۴۲/۱	۱۲۲/۸	۱۱۷/۶
۲/۸±	۴/۳±	۳/۷±	۴/۱±
۱۱۶/۲	۱۸۶/۸	۱۶۰/۱	۱۶۲/۷
۲/۳±	۴/۱±	۲/۵±	۴/۴±

مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد بیان شده‌اند.

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده

ژن‌ها	توالی پرایمرها
GAPDH-f	GGATAGTGAGAGCAAGAGAGAGG
GAPDH-r	ATGGTATTGGAGAGAAGGGAGGG
MFN2-F	AGCTGTTCTCCTCATCCTCTCG
MFN2-R	CAA TGA CCC ACT GTG AGA TGA

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]



نمودار ۱- مقایسه میانگین بیان ژن نسبی mRNA MFN2 گروه‌های تحقیق.

a: تغییرات معنادار نسبت به گروه سالم. b: تغییرات معنادار نسبت به گروه فشارخون

در نهایت نتایج آزمون تعقیبی توکی نشـــان داد که بیان ژن Mfn2 بافت قلب در گروه فشـــارخون کاهش معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت (P=۰/۰۱۸). در مقایســه با گروه فشــارخون، مکمل ALA (P=۰/۰۰۸)، ترکیب تمرین متوســط+مکمل (P=۰/۰۳۹) و تمرین شدید+مکمل (P=۰/۰۱۴) بیان ژن DRP1 بافت قلب را افزایش داد. نکته جالب اینکه تمرین تناوبی شـــدید (P=۰/۹۹۱) و تمرین متوســـط (P=۰/۹۱۶) منجر به افزایش غیرمعنی‌دار نسبت به گروه فشارخون شد. بین گروه های دیگر تفاوت معنی‌داری مشـــاهده نشـــد (P>۰/۰۵) (نمودار ۱).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شش هفته تمرین تناوبی شـــدید و متوســـط بیان ژن Mfn2 بافت قلبی در موش‌های هایپرتنســیو را تغییر نداد. مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر، کوئیرگو و همکاران (۲۰۲۰) نتایج نشان دادند که یک دوره تمرین با شدت متوسط سطح بیان ژن Mfn2 و Opa1 بافت قلب را در موش‌های هایپرتنسیو تغییر نداد. زعفرانیه و همکاران (۱۴۰۰) گزارش کردند که ۱۲ هفته تمرین تناوبی شـــدید بیان ژن Mfn2 قلب را در موش‌های دیابتی تغییر نداد ولی منجر به افزایش بیان ژن Drp1 شـــد (۲۰). عدم تغییر بیان ژن Drp1 و Mfn2 بافت قلبی در موش‌های مبتلا به کبد چرب بعد از ۸ هفته تمرین هوازی با شـــدت متوســـط در مطالعه قهرمانی و همکاران (۱۳۹۸) مشـــاهده شـــد (۲۱). در مقابل، مطالعه دمیرچی و همکاران (۱۳۹۶) نشـــان داد که تمرین تناوبی با شدت‌های مختلف می‌تواند منجر به افزایش پروتئین MFN2 و کاهش پروتئین DRP1 در موش‌های با انفارکتوس قلبی شـــود، هرچند که افزایش پروتئین MFN2 تنها در تمرین تناوبی با شدت متوسط معنی‌داری شـد (۲۲). پیروی و همکاران (۲۰۱۹) اثر دو نوع تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی متوسط را بر پویایی میتوکندریایی عضـــله اســـکلتی را در موش‌های چاق و دیابتی بررسی کردند و گزارش کردند که تمرین تناوبی شدید و تداومی متوسط سطح بیان ژن mfn2 را افزایش و ســـطح بیان ژن Drp1 را کاهش دادند (۲۳). قهرمانی و همکاران (۲۰۱۸) اثر یک دوره تمرین هوازی بر پویایی میتوکندریایی بافت قلب موش‌های با آســـیب ایسکمی – رپرفیوژن را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تمرین منجر به بیان بیشتر Mfn1 و Mfn2 و کاهش Dro1 نســـبت به گروه بیمار شـــد (۲۴). ســـجودی و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

همکاران (۱۳۹۹) در مطالعه خود گزارش کردند که تمرین مقاومتی سطح بیان ژن mfn2 را افزایش و سطح بیان ژن Drp1 را در بافت قلب موش‌های دیابتی شد. از دلایل احتمالی تفاوت در نتایج مطالعات می‌توان به تفاوت در نوع آزمودنی‌ها (دیابتی، کبد چرب، فشارخون)، بافت اندازه‌گیری شده، روش اندازه‌گیری متغیرها، نوع تمرین و شدت و مدت تمرین اشاره کرد (۲۵).

مکانیسم دقیق کنترل بازسازی میتوکندری در بیماری فشارخون به وضوح مشخص نیست. بااین‌حال، به نظر می‌رسد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در این فرایند نقش تنظیمی مهمی داشته باشند. فعالیت ورزشی می‌تواند منجر به تولید ROS میتوکندریایی شود و در نتیجه بیان پروتئین‌های همجوشی و شکافت میتوکندریایی افزایش یابد. به‌طوری‌که شواهد اخیر نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو شکافت میتوکندریایی را افزایش می‌دهد (۲۶). بااین‌حال باید خاطرنشان کرد که ظاهراً نقش ROS در شکافت میتوکندری وابسته به میزان و مدت زمان مواجه با آن باشد. بر این اساس، به نظر می‌رسد شدت‌های مختلف فعالیت ورزشی با سطوح متفاوتی از افزایش ROS همراه است (12) و به دنبال آن پروتئین شکافت و همجوشی را تحت تأثیر قرار دهد. با وجود اثرات متفاوت فعالیت ورزشی در تولید ROS و همچنین دفاع آنتی‌اکسیدانی، بااین‌حال، انجام وهله‌ها و جلسات فعالیت ورزشی در پروتکل‌های تمرینی طولانی مدت نیز منجر به افزایش گذرا در ROS می‌شود که احتمالاً وابسته به شدت و مدت فعالیت ورزشی است.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر شدت تمرین عامل اثرگذاری بر پویایی میتوکندریایی بافت قلب نبود بطوریکه هیچ یک از شدت‌های متوسط و بالای تمرین تناوبی شاخص‌های پویایی میتوکندریایی را تغییر نداد. در رابطه با بررسی اثر شدت‌های تمرین بر پویایی میتوکندریایی مطالعات کمی صورت گرفته است. در این رابطه، دمیرچی و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند که تمرین تناوبی با شدت متوسط نسبت به تمرین تناوبی شدید بر شاخص‌های پویایی میتوکندریایی اثر بهتری داشت. احتمالاً تمرین تناوبی با شدت متوسط منجر به تولید بهینه از ROS شده است که آثار مطلوب‌تر نسبت به تمرین با شدت بالا و پایین بر پروتئین‌های MFN2 و DRP1 داشته است، به‌طوری‌که تمرین تناوبی با شدت بالا با افزایش غلظت بالایی از ROS منجر به کاهش اثرات مطلوب تمرین و نیز تمرین تناوبی با شدت متوسط با سطوح بسیار کمتر منجر به رسیدن به آستانه مورد نظر به منظور تحریک پروتئین های مرتبط با دینامیک میتوکندریایی نشده باشد (۲۲).

فاکتورهای متابولیکی درون سلولی از جمله PGC-1α (یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده های متابولیسم انرژی و نیز بایوژنز میتوکندری) دینامیک میتوکندری را تنظیم می‌کنند که با تأثیر بر همجوشی و شکافت منجر به بازسازی میتوکندریایی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که افزایش بیان PGC-1α بیان mRNA و پروتئین MFN2 در سلول‌های عضلانی را تحریک می‌کند (27). همچنین، افزایش بیان PGC-1α و مسیرهای بیوژنز میتوکندری ناشی از فعالیت ورزشی حساس به ردوکس سلولی می‌باشند به‌طوری‌که مهار ROSبیان PGC-1α و بیان ژن‌های بیوژنز میتوکندری کنترل شده با PGC-1α در عضله اسکلتی را کاهش می‌دهد (28). نقش بیولوژیکی PGC-1α همانند ROS در تنظیم بازسازی میتوکندریایی درنتیجه فعالیت ورزشی در مطالعات مختلف تایید شده است.

به نظر می‌رسد بخشی از تنظیم بیان پروتئین‌های دینامیک میتوکندری می‌تواند درنتیجه فعالیت PGC-1α باشد. در مطالعه دمیرچی و همکاران (۱۳۹۶) که همسو با افزایش MFN2 و کاهش DRP۱، بیان PGC-1α افزایش پیداکرده است (۲۲). اگرچه تنظیم فعالیت PGC-1α در عضله قلب کمتر شناخته شده است و به نظر می‌رسد که شدت فعالیت ورزشی عامل مؤثر بر تحریک و فعال‌سازی PGC-1α باشد (29). مهار فعالیت PGC-1α در نتیجه کاهش در چرخه کلسیم، فعالیت کلسیم کالمودولین کیناز و همچنین کاهش بیان سیرتوئین در مطالعات نشان داده شده است که در مقابل فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق تعدیل کلسیم و افزایش بیان کلسیم کالمودولین کیناز و نیز افزایش بیان سیرتوئین منجر به تحریک فعالیت PGC-1α شود.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

بااین حال عدم کنترل مرگ و میر موش ها خارج از کنترل محقق بود. در نهایت امید است با استفاده از نتایج این تحقیق بتوان دیدگاه روشنی در زمینه تأثیر تمرین تناوبی و مکمل آلفا لیپوئیک اسید در اختیار محققین و متخصصین قرار داد تا با استفاده از آن بتوانند به بهترین نحو ممکن بر نامه‌ریزی کرده و در نتیجه پرفشارخونی را کاهش دهند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج استفاده از تمرین تناوبی و مکمل آلفا لیپوئیک اسید ممکن است پویایی میتوکندریایی در قلب موش‌های پرفشارخونی بهبود بخشد.

References

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet. 2005;365(9455):217-23.
2. Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. Mol Aspects Med. 2004;25:365 –451.
3. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. Cell. 2013;155:160–171
4. Disatnik MH, Ferreira JC, Campos JC, Gomes KS, Dourado PM, Qi X, et al. Acute inhibition of excessive mitochondrial fission after myocardial infarction prevents long-term cardiac dysfunction. J Am Heart Assoc. 2013;2(5):e000461.
5. Hall A, Burke N, Dongworth R, Hausenloy D. Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. Br J Pharmacol. 2014;171(8):1890-906.
6. Iglewski M, Hill JA, Lavandero S, Rothermel BA. Mitochondrial fission and autophagy in the normal and diseased heart. Curr Hyperten Rep. 2010;12(6):418-25.
7. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and endothelial function. Circ Res. 2013;112:1171–1188.
8. Stojak M, Milczarek M, Kurpinska A, Suraj-Prazmowska J, Kaczara P, Wojnar-Lason K, et al. Protein Disulphide Isomerase A1 Is Involved in the Regulation of Breast Cancer Cell Adhesion and Transmigration via Lung Microvascular Endothelial Cells. Cancers. 2020;12:2850.
9. Swati S, Sonia, Sheetal K. Effects of Aerobic Versus Resistance Training on Blood Pressure in Hypertensive Patients. J Anesth Crit Care. 2015;3(3):00098.
10. Oliveira L, Oliveira K, Migliolo L, Franco O. Effect of Moderate Exercise on Mitochondrial Proteome in Heart Tissue of Spontaneous Hypertensive Rats. Am J Hyperten. 2016;29(6):696-704.
11. Jiang HK, Wang YH, Sun L, He X, Zhao M, Feng ZH, et al. Aerobic interval training attenuates mitochondrial dysfunction in rats post-myocardial infarction: roles of mitochondrial network dynamics. Int J Mol Sci. 2014;15(4):5304-22.
12. Parker L, McGuckin TA, Leicht AS. Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. Clin Physiol Func Imaging. 2014;34(5):377-83.
13. Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. Exerc Sport Sci Rev. 2012;40(3):159.
14. Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: Molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. Can J Physiol Pharmacol. 2015;93:1021–1027.
15. Huang EA, Gitelman SE. The effect of oral alpha-lipoic acid on oxidative stress in adolescents with type 1 diabetes mellitus. Pediatr Diabetes. 2008;9(3 Pt 2):69-73.
16. Midaoui A, Fantus G, Boughrous A, Couture R. Beneficial Effects of Alpha-Lipoic Acid on Hypertension, Visceral Obesity, UCP-1 Expression and Oxidative Stress in Zucker Diabetic Fatty Rats. Antioxidants. 2019;8:648.
17. Sung J, Jo YS, Kim SJ, Ryu JS, Kim MC, Ko HJ. Effect of Lutein on L-NAME-Induced Hypertensive Rats. Korean J Physiol Pharmacol. 2013;17:339-345.
18. Faridnia M, Mohebbi H, Khalafi M, Moghaddami K, Khalafi M. The effect of interval and continuous training on the content of perilipin 1, ATGL and CGI -58 in visceral adipose tissue of obese male rats. SJKU. 2019;24(1):78 -89.
19. Dworacka M, Chukanova G, Iskakova S, Kurmambayev Y, Wesołowska A, Frycz B. New arguments for beneficial effects of alpha-lipoic acid on the cardiovascular system in the course of type 2 diabetes. Eur J Pharma Sci. 2019;117:41-47.
20. Zaafrani S, Souri R. The effect of twelve weeks of intense intermittent exercise on mitochondrial dynamics of cardiac myocytes of type 2 diabetic rats. Sports Biosci. 2021;13(1):25-38.
21. Ghahremania R, Damirchi A, Salehia I, Komakia A, Esposito F. Mitochondrial dynamics as an underlying mechanism involved in aerobic exercise

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]

training-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. Life Sci. 2018;213:102–108.

22. Damirchi A, Ebadi B. The effects of the intensity of interval training on mitochondrial dynamics-related proteins in the heart of male rats with myocardial infarction. Appl Exerc Physiol. 2019;14:28:159-172.

23. Peyravi A, Yazdanpanahi N, Nayeri H, Hosseini SA. The effect of endurance training with crocin consumption on the levels of MFN2 and DRP1 gene expression and glucose and insulin indices in the muscle tissue of diabetic rats. J Food Biochem. 2019;00:e13125.

24. Ding H, Jiang N, Liu H, Liu X, Liu D, Zhao F, et al. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2010;1800:250–256.

25. Sojoudi S, Piri M, Farzangi P, Delfan M. The effect of 6 weeks resistance exercise preparation on mitochondrial dynamics in heart tissue of diabetic rats. J Sports Biol Sci. 2017;10(1):28-19.

26. Gomez-Lazaro M, Bonekamp NA, Galindo MF, Jordán J, Schrader M. 6- Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. Free Rad Biol Med. 2008;44(11):1960-9.

27. Liesa M, Borda-d'Água B, Medina-Gómez G, Lelliott CJ, Paz JC, Rojo M, et al. Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1β. PloS One. 2008;3(10):e3613.

28. Kang C, O'moore KM, Dickman JR, Ji LL. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α signaling is redox sensitive. Free Rad Biol Med. 2009;47(10):1394-400.

29. Huh JY, Mougios V, Kabasakalis A, Fatouros I, Siopi A, Douroudos II, et al. Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may directly modulate muscle metabolism through AMPK activation. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 99(11):E2154-E61.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-10]