مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۱۲، اسفند ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر یک دوره تمرین مقاومتی به همراه مکمل اسپیرولینا و مکمل گلوتامین بر بیان ژن MyoD در عضله بازکننده طویل انگشتان پای موش‌های نر

آمنه زندی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

طاهره باقرپور: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران (* نویسنده مسئول) bagherpoor_ta@yahoo.com

نعمت ا... نعمتی: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: جهت مهار عوارض ناشی از فعالیت سنگین بررسی عملکرد ترکیبات مکمل با منشا ارگانیک و غیر ارگانیک حایز اهمیت است. بنابراین هدف تحقیق، مقایسه اثر هم‌زمان مکمل اسپیرولینا و گلوتامین متعاقب یک دوره ورزش مقاومتی بر بیان ژن MyoD در عضله تند انقباض بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ سر موش نر نژاد ویستار در گروه‌های کنترل (۱۰ = تعداد)، تمرین (۱۰ = تعداد)، اسپیرولینا+ تمرین (۱۰ = تعداد)، گلوتامین+ تمرین (۱۰ = تعداد) تقسیم شدند. موش‌های گروه تمرین، به مدت دو هفته و هر هفته ۳ روز برنامه راه رفتن روی سطح شیبدار (۴ ست و هر ست با ۵ تکرار و ۳۰ ثانیه استراحت بین تکرارها) انجام دادند. گروه مکمل پنج روز قبل از اجرای پروتکل اصلی، روزانه یک بار و هر بار نیم گرم /کیلوگرم وزن بدن مصرف مکمل داشتند. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک راهه تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بین میزان بیان نسبی ژن MyoD در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P \leq ۰/۰۰۱$). همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که این تفاوت بین گروه تمرین و تمرین+ اسپیرولینا ($P \leq ۰/۰۰۱$) و نیز گروه تمرین و تمرین+ گلوتامین معنی‌دار می‌باشد ($P \leq ۰/۰۰۱$). در حالی‌که بین دو گروه تمرین+ اسپیرولینا و تمرین+ گلوتامین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P= ۰/۰۵۵$).

نتیجه‌گیری: ورزش مقاومتی موجب فراخوانی عضلات تند انقباض و تأثیر روی میزان بیان ژن MyoD می‌شود. مصرف مکمل‌های ارگانیک شیوه مناسب در مهار عوارض ناشی از فعالیت بدنی سنگین می‌باشد.

کلیدواژه‌ها

تمرین مقاومتی،
اسپیرولینا،
گلوتامین،
ژن MyoD

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۰
تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Zandi A, Bagherpoor T, Nemati N. The Eeffect of a Resistance Training Course with Spirulina Supplementation and Glutamine Supplementation on Gene Expression (MyoD) in the Long Extensor Muscle of Male Mice. Razi J Med Sci. 2021;28(12):309-318.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;28(12):x309-318. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

The Eeffect of a Resistance Training Course with Spirulina Supplementation and Glutamine Supplementation on Gene Expression (MyoD) in the Long Extensor Muscle of Male Mice

Ameneh Zandi: PhD student in sports physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

Tahereh Bagherpoor: Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran (* Corresponding author) bagherpoor_ta@yahoo.com

Nematolah Nemati: Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

Abstract

Background & Aims: Increasing the intensity of physical activity and consequently increasing oxidative stress causes the formation of free radicals in the body and these free radicals cause the destruction of biological cell structures such as proteins, fats, membranes and hereditary structures. Considering that taking supplements can be a good way to control the effects of strenuous physical activity; therefore, it is important to study the mechanism of action of complementary compounds of organic and non-organic (industrial) origin and compare their effects and performance at the biochemical and genetic level. In this regard, the study of the expression of genes related to the inhibition of oxidative stress can be a direct and appropriate solution to evaluate the function of various supplements. Satellite cells below the basal laminal layer of skeletal muscle are located exactly adjacent to myofibrillar sarcolemma and make up 2 to 7% of the nuclei of a muscle fiber. The number of satellite cells depends on the type of muscle fiber, age, and species. The amount of these cells varies at different ages; In infant, adult, and older mice, they make up 30, 4, and 2 percent of the muscle nuclei, respectively, and as they age, the decrease in satellite cells increases the muscle nuclei of glycolytic fibers. Proximity to capillaries, muscle nuclei, and neuromuscular junctions is associated with increased satellite cell density; Therefore, their amount in oxidative fibers is 5 to 6 times higher compared to glycolytic fibers. These adult muscle-specific germ cells are normally dormant and activate and enter the cell cycle in response to induced stress, such as induced mechanical load or muscle damage. The next generation of activated satellite cells are called myogenic precursor cells (mpc), which repair the damaged muscle fibers or hypertrophy after several rounds of cell division and before merging with existing myofibrils or forming new myofibrils, respectively. The ability of satellite cells to migrate and move depends on the integrity and integrity of the cell's basement membrane. After rupture (severe destruction) of the basement membrane due to muscle damage, satellite cells migrate to adjacent damaged myofibrils using tissue connections, but if the tissue damage is limited and rupture of the basal lamina has not occurred. Satellite cells move to the affected area from the beginning of the healthy myofibril section (below the membrane) to participate in the repair of muscle tissue. With the activation of satellite cells (six hours after muscle injury) the expression of MyoD gene increases rapidly, therefore this transcription factor in adult skeletal muscle is activated by markers and proliferation of satellite cells. The amount of MyoD transcription factor mRNA varies at different ages and is higher in rapid-twitch muscles. In animal models, the amount of MyoD gene protein is lower in the rapid and slow-twitch muscles of older rats. This value is lowest in the soleus muscle and therefore the response of the MyoD gene of the soleus muscle (slow-twitch muscle) is also lower than that of the extensor digitorum longus muscle (rapid-twitch muscle). With this description, the aim of this study was to compare the effects of organic and inorganic supplementation on myoD gene expression in twitch muscle after a

Keywords

Resistance Training,

Spirulina,

Glutamine,

MyoD Gene

Received: 02/10/2021

Published: 20/02/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

high-intensity resistance activity to determine whether organic and inorganic supplementation on myoD gene expression.

Methods: In this experimental study, 40 Wistar rats with an average weight of 100-200 g were prepared and in the control groups (number = 10), exercise (number = 10), Spirulina + exercise (number = 10), glutamine + exercise (number = 10) were divided. Mice in the exercise group performed a two-week exercise program of 3 days per week of walking on a sloping surface (4 sets, 5 repetitions, 30 seconds rest between repetitions), and the supplement + exercise group performed a supplement program five days before the main protocol. They consumed half a gram/kg of body weight once a day. The obtained data were evaluated by One Way ANOVA.

Results: The results showed that there was a significant difference between the relative expression of MyoD gene in the study groups (P> 0.001). Also, the results of Tukey post hoc test showed that this difference between training and exercise + spirulina group (P> 0.001) and also training and exercise + glutamine group was significant (P> 0.001). While there was no significant difference between the two groups of exercise+ spirulina and exercise+ glutamine (P= 0.055).

Conclusion: In general, it can be concluded that taking organic supplements is a good way to prevent reduced expression and the amount of damage to muscle fibers after high-intensity resistance exercise. The mean variables of MyoD gene expression in soleus muscle tissue (slow-twitch) of adult male Wistar rats were different after taking an organic spirulina supplement and performing a session of intense resistance activity, so that this difference indicates the effect of taking an organic spirulina supplement on alteration and reduction of MyoD gene expression in soleus muscle tissue. The mean variables of MyoD gene expression in extensor digitorum longus muscle tissue (rapid-twitch) of adult male Wistar rats after taking Spirulina organic supplement and performing a session of intense resistance activity were different, so that this difference indicates the effect of taking organic supplement. Finally, one session of intense resistance activity increased the expression of MyoD gene in slow-twitch muscles more than rapid-twitch muscles. These results may be due to more potential damage to the slow-twitch fibers than the rapid-twitch fibers, or it may indicate a response to the development of adaptations related to the performance of resistance exercises in such fibers. In addition, taking an organic spirulina supplement increased the expression of the MyoD gene, so that taking a five-day course of this supplement increased the expression of this gene in rapid-twitch muscles more than slow-twitch muscles. The important point is that in the group of spirulina organic supplementation, before performing a session of intense resistance activity, the expression of MyoD gene is lower than the case of intense resistance activity without supplementation. Therefore, it is recommended that with high resistance activity, appropriate supplements such as organic spirulina supplementation be used to reduce the expression of MyoD gene, which is likely to increase due to damage to muscle fibers. In particular, it has had better and more favorable effects in slow-twitch muscle fibers that have shown a greater increase in MyoD gene expression after intense resistance activity.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Zandi A, Bagherpoor T, Nemati N. The Eeffect of a Resistance Training Course with Spirulina Supplementation and Glutamine Supplementation on Gene Expression (MyoD) in the Long Extensor Muscle of Male Mice. Razi J Med Sci. 2021;28(12):309-318.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

مقدمه

افزایش شدت فعالیت‌های بدنی و درنتیجه‌ی آن افزایش فشارهای اکسیداتیو موجب ایجاد رادیکال‌های آزاد در بدن شده و این رادیکال‌های آزاد باعث تخریب ساختارهای زیستی سلول از قبیل پروتئین‌ها، چربی‌ها، غشاها و ساختارهای وراثتی می‌شوند (۱). ظرفیت مهاجرت و جابه‌جایی سلول‌های شیمیوتاکسی، ماهواره‌ای به یکپارچگی و سالم بودن غشاء سلول بستگی دارد (۲). افزایش فعالیت‌های بدنی و درنتیجه‌ی آن افزایش فشارهای اکسیداسیونی موجب ایجاد رادیکال‌های آزاد در بدن می‌شود که این رادیکال‌های آزاد موجب ایجاد سمیت در بدن و در نتیجه تخریب ساختارهای زیستی سلول از قبیل پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA می‌شود (۳). تمرین مقاومتی از طریق فرایند فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای، تکثیر، شیمیوتاکسی و ادغام با میوفیبریل‌های موجود در ترمیم عضلانی شرکت می‌کنند (۴). نشانه‌ی این فعال‌سازی، افزایش بیان ژن MyoD است (۵). سلول‌های ماهواره‌ای زیر غشای پایه عضلات اسکلتی، دقیقاً در مجاورت سارکولما میوفیبریل‌ها قرار دارند و ۲ تا ۷ درصد هسته‌های یک تار ویژه را تشکیل می‌دهند (۶). تعداد سلول های ماهواره‌ای به نوع تار عضلانی، سن و گونه بستگی دارد (۷). تمرینات ورزشی موجب آسیب‌های ریز عضلانی می‌شود که با فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای و به تبع آن افزایش ژن MyoD همراه است (۸). اما پاسخ ژن MyoD به فعالیت‌های بدنی متناقض است (۹). مورایس (Morais) و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه خود گزارش کردند که سطح بیان ژن MyoD پس از یک جلسه تمرین مقاومتی بهبود یافت (۱۰). الویرا (Oliveira) و همکاران (۲۰۱۸) نیز در مطالعه اثربخشی یک دوره تمرین مقاومتی بر سطح بیان ژن MyoD، دریافتند که سطح بیان این ژن، پس از تمرین مقاومتی شدید کاهش یافت (۱۱). لوک (Luk) و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهش خود گزارش کردند که پس از یک دوره تمرین مقاومتی، سطح بیان ژن MyoD افزایش یافت (۷). نتایج مطالعات که با افزایش سن کاهش سلول‌های ماهواره‌ای موجب افزایش هسته‌های عضلانی (تارهای گلیکولیتیک و اکسیداتیو) و کاهش تعداد کلی سلول‌های ماهواره‌ای می‌شود (۷، ۱۲). اگر آسیب بافتی محدود باشد سلول‌های جوانه‌ای برای مشارکت در ترمیم بافت عضلانی از ابتدای بخش سالم میوفیبریل در زیر غشاء به محل آسیب دیده حرکت می‌کنند (۱۳). با فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای بیان ژن MyoD به سرعت افزایش می‌یابد. به همین دلیل فاکتور رونویسی را در عضلات اسکلتی بالغ، مارکر فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای به حساب می‌آورند (۱۴). تاکنون روش‌هایی درجهت پیشگیری یا درمان پیشنهاد شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به مصرف داروهای ضدالتهابی غیر استیروئیدی، تمرین کردن و رژیم غذایی اشاره کرد به طوری که جهت پیشگیری از فرآیند آسیب می‌توان رژیم‌های غذایی حاوی مکمل‌های ارگانیک (اسپرولینا) و غیرارگانیک (گلوتامین) را در برنامه غذایی گنجاند (۱۵).

مکمل گلوتامین به منظور به حداقل رساندن موجودیت آن در پلاسما انجام می‌گیرد (۱۶). فعالیت ورزشی سنگین که با انقباض‌های شدید و با اضافه بار همراه است موجودیت گلوتامین را در پلاسما کاهش می‌دهد (۱۷). ناتوانی عضلات در فراهم نمودن گلوتامین سرعت تکثیر لنفوسیت‌ها در پاسخ به میتوژن‌ها را کاهش می‌دهد (۱۸). همچنین مکمل اسپرولینا نیز به سبب دارا بودن طیف متنوعی از مواد مغذی و ویژگی‌های کمک درمانی اثبات شده که می‌تواند نقش بالقوه‌ای در رژیم غذایی افراد مختلف داشته باشد (۱۵). همچنین اسپرولینا در تشابه با سایر میکرو ارگانیسم‌ها موجب حفاظت سلولی می‌شود. اسپرولینا ترکیبی از ۸ اسید آمینه ضروری با نسبت مناسب می‌باشد (۱۹). با توجه به اینکه مصرف مکمل‌های ارگانیک در مقایسه با مکمل‌های صناعی اثرات جانبی کمتری دارد مکمل‌های گیاهی در برخی موارد می‌تواند جایگزین مناسبی برای دارو درمانی باشد (۲۰). با توجه به اینکه مصرف مکمل‌ها می‌تواند راهکاری مناسب برای مهار عوارض ناشی از فعالیت‌های سنگین باشد، ترکیبات مکمل با منشاء ارگانیک و غیر ارگانیک و مقایسه عملکرد آن‌ها در سطحی بیوشیمیایی و ژنتیک بسیار حائز اهمیت است. بررسی میزان بیان ژن مربوط به مهار استرس‌های اکسیداتیو راهکار مستقیم در جهت بررسی عملکرد مکمل‌های مختلف می‌باشد. در تحقیق حاضر اثر همزمان ورزش مقاومتی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

با شدت بالا و مکمل‌های ارگانیک (اسپیرولینا) و غیرارگانیک (گلوتامین) بر بیان ژن MyoD در عضله‌ی دراز انگشتان پای موش‌های نر بالغ می‌پردازد.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تحقیقات بنیادی است که به روش تجربی انجام گرفت و با کد اخلاق IR.IAU.M.REC.1400.021 به تایید کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت رسیده است. در این مطالعه، تعداد ۴۰ سر موش با سن شش هفته پس از تهیه از مرکز پژوهش حیوانات آزمایشگاه همدان وزن کشی با میانگین وزنی ۱۲۰-۱۰۰ گرم، تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: کنترل (۱۰ = تعداد)، تمرین (۱۰ = تعداد)، تمرین+ اسپیرولینا (۱۰ = تعداد)، تمرین+ گلوتامین (۱۰ = تعداد).

همان ابتدای پژوهش از گروه کنترل به عنوان گروه پایه نمونه‌برداری بافت انجام و سپس گروه‌های تمرینی مدت دو هفته در شرایط کنترل شده از نظر دما (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (۵±۵۰ درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته، نگهداری شدند. در طی این دوره، تمامی موش‌ها به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب استفاده کردند. در طی این دو هفته، موش‌ها تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت مقاومتی با شدت بالا روی سطح شیب‌دار قرار گرفتند. در این دوره مقدار شوک الکتریکی به میزان ۰/۱ میلی ولت ثابت بود. موش‌های مورد آزمایش در این تحقیق در قفس‌های پلی کربنات ساخت شرکت انحصاری رازی راد با اندازه تقریبی ۲۱ × ۳۴ × ۵۴ سانتی‌متر نگهداری شدند. متغیر وابسته میزان بیان ژن MyoD در عضله تند انقباض می‌باشد. متغیرهای مستقل ورزش مقاومتی با شدت بالا و مکمل پودر گلوتامین و مکمل قرص ۵۰۰ میلی‌گرمی اسپرولینا که به صورت محلول امولسیونی مخلوط در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر ۵ روز قبل از اجرای پروتکل اصلی تمرین روزانه یکبار نیم گرم/ کیلوگرم وزن بدن مکمل مورد نظر به گروه‌های مصرف مکمل گاواژ شد (۱۸). همه گروه‌ها به صورت آزادانه با آب و غذای معمولی جوندگان از محصولات شرکت خوراک دام پارس بر اساس وزن‌کشی روزانه با ترازو استاندارد ویژه با توجه به جیره طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن و دسترسی به آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی لیتری ویژه صنایع رازی در اختیار آن‌ها قرار گرفت.

برنامه یک جلسه فعالیت مقاومتی با شدت بالا در این مطالعه به شرح ذیل بود: دوره آشنایی موش‌های گروه تجربی با برنامه فعالیت مقاومتی، دو هفته (شش جلسه) به طول انجامید. در سه جلسه هفته اول، موش‌ها از یک سطح شیب‌دار به ارتفاع یک و نیم متر و شیب ۴۵ درجه بالا رفتند؛ در حالی که یک کمربند پارچه‌ای حاوی کیسه شن به میزان ۲۰ درصد وزن بدن موش‌ها به دور تنه آن‌ها متصل شده بود. در سه جلسه هفته دوم و پس از توزین مجدد، موش‌ها از همان سطح شیب‌دار ولی با زاویه ۸۵ درجه بالا رفتند. برنامه گرم کردن و سرد کردن نیز به مدت ۵ دقیقه قبل و بعد از فعالیت مقاومتی به صورت راه رفتن روی سطح صاف و بدون بار اضافی اجرا شد. پس از پنج روز مصرف مکمل و توزین مجدد، هر دو گروه موش‌های تجربی در یک جلسه فعالیت مقاومتی (صعود از سطح شیب‌دار صاف به ارتفاع یک و نیم متر و شیب ۸۵ درجه) با ۴ ست، ۵ تکرار، ۳۰ ثانیه استراحت بین تکرارها و ۲ دقیقه استراحت بین ست‌ها شرکت کردند. بار اولیه، معادل ۵۰ درصد وزن بدن موش‌ها در نظر گرفته شد. سپس در ابتدای اجرای هر ست، ۱۰ درصد وزن بدن موش‌ها به بار اولیه اضافه شد، به گونه‌ای که هر موش در پایان ست چهارم، ۸۰ درصد وزن بدن خود را حمل می‌کرد (۲۱).

استخراج بافت به این صورت بود که همه موش‌ها ۶ تا ۸ ساعت بعد از آخرین تمرین در دستگاه دسیکاتور، با استفاده از گاز CO_2 بیهوش و زمانی که به هیچ تحریک اعمال شده پاسخ ندادند، با رعایت مسائل اخلاقی و در محیط کاملاً استریل با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش استخراج بافت تند انقباض انجام و ثبت وزن دقیق آن‌ها با ترازوی آزمایشگاهی و دقت ۰/۰۰۰۱ گرم انجام شد.

بافت عضله‌ی تند انقباض، درون میکروتیوب های ۱/۵ یا ۲ میکرولیتری حاوی RNA Later در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای نگهداری بافت مورد نظر جهت استخراج RNA از محلول‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

سدیم سیترات ۱ مولار (۲۵ میلی‌لیتر)، آمونیوم سولفات (۷۰۰ گرم)، آب مقطر استریل (۹۳۵ میلی‌لیتر)، ۵/۰ EDTA (۴۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. در زیر هود این مواد با یکدیگر ترکیب و با استفاده از اسید سولفوریک PH آن به ۵ رسانده شده و در آخر، حجم محلول به ۱۵۰۰ میلی لیتر افزایش یافت.

برای از بین بردن RNase خارجی از محلول ضدعفونی شامل H_2O_2 ٪۵ (۷۱/۴۲ میلی لیتر)، SDS ۰/۱ ٪ (۵ میلی‌لیتر)، ۰۵/۰ NaOH مولار (۱ گرم) استفاده شد. برای استخراج mRNA از بافت، این گونه انجام شد که ابتدا مقداری از بافت مورد نظر روی لام قرار داده شده و توسط تیغ و پنس کاملاً خرد شد. بافت خرد شده توسط پنس در انتهای میکروتیوب‌های ۲ میکرولیتری قرار گرفت. به طوری که تمامی بافت‌ها در انتهای میکروتیوب جمع شدند. سپس با استفاده از سمپلر، روی نمونه‌ها یک میلی‌لیتر معادل ۱۰۰۰ میکرولیتر از کیت plus-RNX ساخت شرکت سینا ژن ریخته شد. به هر یک از میکروتیوب‌ها به مدت ۵ ثانیه با دستگاه ورتکس حرکت گردابی داده شده تا مواد موجود در انتهای میکروتیوب‌ها به خوبی مخلوط شود. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط اینکوبه شدند. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفورم روی نمونه‌ها ریخته شده و به مدت ۱۵ ثانیه با استفاده از حرکت دورانی دست تکان داده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در محیط یخ اینکوبه شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه درون دستگاه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. در انتها، میکروتیوب‌ها به آرامی و بدون تکان خوردن از سانتریفیوژ خارج شده و با استفاده از سمپلر از لایه رویی محلول بدست آمده بدون آن که سرسمپلر به لایه میانی برخورد کند، ۴۰۰ میکرولیتر برداشته شده و به داخل میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری فاقد RNase انتقال داده شد. پس از انتقال فاز آبی، مایع باقیمانده در میکروتیوب ۲ میکرولیتری دور ریخته شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به فاز آبی میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری اضافه کرده و چندین بار به آرامی با دست تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محیط یخ اینکوبه شد. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه درون سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شده و در انتها و پس از خروج آرام میکروتیوب‌ها از سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شده و رسوب باقیمانده که همان RNA هدف است با ۱۰۰۰ میکرولیتر از الکل ۷۰ درصد توسط سمپلر ترکیب شد. جهت انجام آزمایشات مولکولی از مواد و کیت‌های زیر استفاده شد:

کیت plus-RNX ساخت شرکت سینا ژن، کیت cDNA، کیت Real Time-PCR ساخت شرکت ویراژن.

برای رونویسی RNA به cDNA از کیت ساخت شرکت تاکارا ژاپن استفاده شد. برای تهیه ماستر میکس جهت سنتز cDNA ابتدا تمامی موارد زیر را به همان نسبت ذکر شده در پروتکل کیت، به وسیله سمپلر درون یک میکروتیوب ریخته و سپس ۰/۵ میکرولیتر از RNA مورد نظر را به مستر میکس اضافه شد. ترکیب مواد در حوضچه یخ انجام شد. پس یک میکرولیتر از cDNA سنتز شده به ماستر میکس اضافه شده و در نهایت طبق برنامه دمایی زیر، PCR در درون دستگاه اجرا شد. جهت اطمینان از سنتز cDNA مورد نظر، محصول را درون ژل آگارز لود کرده و سپس درون دستگاه UV باند مورد نظر حاصل از سنتز cDNA مشاهده شد.

قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن کارایی ژن رفرنس (GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate-Dehydrogenase) و ژن هدف (MyoD) بررسی شد و میزان کارایی این دو ژن در بیشترین مقدار خود عدد ۱ بود. در ادامه از تکنیک Real Time-PCR استفاده شد. ابتدا ۱۲/۵ میکرو لیتر از مستر میکس (SYBR Green Master Mix) سایبر گرین توسط سمپلر درون میکروتیوب ریخته شده در این پژوهش برای هر سیکل PCR به تعداد ۴۰ نمونه از ژن هدف, ۱۰ نمونه از ژن مرجع و ۲ نمونه به عنوان NTC شامل تمامی ترکیبات مستر میکس بجز cDNA را در میکروتیوب-های ۰/۲ میکرولیتر آماده شد. تمامی نمونه‌ها شامل ژن‌های هدف و مرجع به صورت Duplicate بود. تمامی مراحل فوق در زیر هود و در تاریکی و در شرایط استریل انجام شد. بعد از آماده سازی، نمونه‌ها درون دستگاه قرار داده شده و تعداد سیکل‌ها و پروتکل دمایی به صورت زیر تنظیم شد. پس از پایان کار خط

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

دمای پرایمر	پرایمر	اندازه‌ی محصول (BP)	توالی پرایمرها
۵۸	GAPDH	(F)20bp	AACCCATCACCATCTTCCAG
		(R)20bp	CACGACATACTCAGCACCAG
۵۸	MyoD	(F) 22 bp	TCTGATGGCATGATGGATTAAC
		(R) 18 bp	TAGTAGGCGGCGTCGTAG

R: معکوس F: پیشرو BP: جفت باز

آستانه برای بهترین حالت در نرم افزار دستگاه PCR Real time تنظیم شد.

نحوه دریافت پرایمرها بدین صورت بود که پرایمرها به صورت ویال لیوفیلیزه دریافت شده و سپس با بافر TE شرکت سینا ژن و به نسبتی که روی ویال ذکر شده بود، رقیق شد. ابتدا ارزیابی ژن رفرنس GAPDH و ژن هدف صورت گرفت و میزان کارایی این دو ژن در جدول شماره ۱ طراحی شده است پس از آن در داخل لوله‌های نام گذاری شده به مقدار ۱۸۰ میکرولیتر بافر TE و ۱۰ میکرولیتر پرایمر فوروارد (F) و ۱۰ میکرولیتر پرایمر ریورس (R) ریخته شد. توالی، طول و نوع پرایمر طراحی شده برای ژن MyoD در جدول ۱آمده است.

سنتز cDNA و پرایمرها، توالی‌های ژن‌های مورد نظر از طریق نرم افزارهای Gene Script و primer Design سایت NCBI طراحی و صحت آن توسط نرم-افزارهای Blast و Oligo7 تأیید شد.

پس از انجام واکنش PCR، سیکل‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های گروه‌ها در یک صفحه نرم افزار اکسل جمع‌آوری و با قرار دادن آن‌ها در فرمول‌های ΔΔCt و ΔΔCt-۲ نسبت میزان بیان ژن‌های هدف و مرجع با یکدیگر مقایسه شد. داده‌های به دست آمده از دستگاه Real Time PCR به صورت CT (Cycle Threshold) (میانگین CT برای هر نمونه) بودند. با استفاده از نرم‌افزار Excel به ΔΔCt تبدیل شدند. سپس با استفاده از فرمول ΔΔCt-۲ اعداد نهایی به دست آمد. با انتقال این اعداد به نرم افزار SPSS ابتدا پرت بودن داده‌ها بررسی شد که مشخص شد داده‌ای پرتی وجود ندارد.

برای آزمون طبیعی بودن توزیع متغیرها از آزمون شاپیروویلک و برای آزمون تجانس واریانس متغیرها از آزمون لوین استفاده شد. همچنین در بخش آمار استنباطی، آزمون واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی مورد استفاده قرار گرفت. شایان ذکر است که آزمون‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ در سطح معناداری P< ۰/۰۵ تحلیل شدند.

یافته‌ها

در جدول ۲ سطح بیان ژن MyoD در بافت عضله تند انقباض گروه‌های تحقیق نسبت به گروه کنترل مقایسه شده و ارائه گردید.

در جدول ۳، نتایج تحلیل واریانس یک راهه نشان دهنده آن است که بین میانگین‌های متغیر بیان ژن MyoD در بافت عضله بازکننده دراز انگشتان (تند انقباض) موش‌های نر بالغ نژاد ویستار در گروه‌های مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P ≤ ۰/۰۰۱ و F =۱۴۹/۶۰۱).

نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد که این تفاوت بین گروه‌های تمرین مقاومتی با مکمل ارگانیک معنی‌دار می باشد (P ≤ ۰/۰۰۱). همچنین تفاوت بین گروه‌های تمرین با مکمل غیرارگانیک نیز که نشان‌دهنده اثر مصرف مکمل غیرارگانیک گلوتامین بر تغییرات بیان ژن MyoD در بافت عضله بازکننده دراز انگشتان (تند انقباض) موش‌های نر بالغ نژاد ویستار است نیز معنی‌دار می‌باشد (P ≤ ۰/۰۰۱). در حالی که مقایسه بین دو گروه تمرین+ مکمل ارگانیک و تمرین+ غیرارگانیک نشان داد که بین این دو گروه در تغییر و کاهش میزان بیان ژن MyoD تفاوتی وجود ندارد (P= ۰/۰۵۵).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که مقایسه اثر متغیرهای فعالیت مقاومتی و مکمل‌های ارگانیک اسپیرولینا و غیرارگانیک گلوتامین و تعامل آن‌ها در تغییرات متغیر میزان بیان ژن MyoD در بافت عضله تند انقباض موش‌های نر بالغ مؤثر است. این نتایج با یافته دیگر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

جدول ۲- سطح بیان ژن MyoD در بافت عضله تند انقباض نسبت به گروه کنترل در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	میانگین	انحراف استاندارد	تفاوت میانگین‌ها
تمرین	۶/۰۵	۰/۱۵	۵/۰۵
تمرین+ مکمل اسپیرولینا	۴/۹۹	۰/۱۶	۳/۹۹
تمرین+ مکمل گلوتامین	۵/۱۶	۰/۱۱	۴/۱۶

جدول ۳- نتایج آزمون آماری تفاوت میانگین‌های بیان ژن MyoD در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	منبع تغییرات	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	مقدار F	معنی‌داری
بیان ژن MyoD	بین گروهی	۶/۴۴۱	۲	۳/۲۲۱	۱۴۹/۶۰۱	P ≤ ۰/۰۰۱
	درون گروهی	۰/۵۸۱	۲۷	۰/۰۲۲		

محققان مانند موریس (Morais) و همکاران (۲۰۱۸) (۱۰)، الویرا (Oliveira) و همکاران (۲۰۱۸) (۱۱) و لوک و همکاران (۲۰۱۹) (۷) که گزارش کردند به دنال تمرین مقاومتی و مکمل‌های ارگانیک و غیرارگانیک، بیان ژن MyoD تعدیل می‌شود، همسو می‌باشد. اغلب یافته های علمی اشاره نمودند که اسپرولینا یک لینک اتصالی میان باکتری‌ها و گیاهان است. با ساختاری ساده اما پیچیده از زمان باستان اسپرولینا به عنوان مکمل تغذیه استفاده می‌شد ولی رابطه علمی آن با سلامت هنوز ثابت نشده بود (۸). اکنون با تمرکز به مکانیسم میکروسکپی پی به اثرات سودمند این مکمل ارگانیک بر کاهش شاخص‌های فشار اکسایشی، تقویت سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی و کاهش استرس های اکسیداتیو و نیز جلوگیری از صدمات عضلانی پی برده-اند (۱۴). در حمایت از این یافته‌ها می‌توان به مطالعاتی اشاره کرد که نشان دهنده تاثیر حفاظتی مکمل ارگانیک (اسپرولینا) در جلوگیری از تخریب DNA در موش‌ها بودند که مصرف این مکمل شیوه مناسبی برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از استرس اکسایشی در عضوله می‌باشد (۹).

همچنین گلوتامین فراوان‌ترین اسید آمینه موجود در پلاسما و عضلات اسکلتی است (۲۲). به طوری که حدوداً بیش از ۶۰ درصد ذخایر اسید آمینه درون عضلانی را تشکیل می‌دهد (۲۳). مکمل‌سازی گلوتامین توسط ورزشکاران به هنگام ورزش‌های طولانی مدت و وامانده‌ساز مرسوم است. اما اثر آن روی تمرینات قدرتی یا آسیب‌های عضلانی ناشی از انقباض‌های شدید کمتر مطالعه شده است (۲۴). ذخایر گلوتامین عضله متعاقب برخی فعالیت‌های متابولیکی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۲۵). به لحاظ تئوری، گلوتامین دارای اثرات نیروافزا در ورزش‌های مختلف است. گلوتامین سنتز گلیکوژن عضلانی را سرعت می بخشد و به افزایش بالقوه قدرت عضلانی منجر می‌شود (۸). برخی محققان این فرضیه را مطرح نموده‌اند که آن دسته از ورزشکارانی که درگیر بیش تمرینی یا ورزش‌های سنگین هستند به نوعی با کاهش سطوح گلیکوژن پلاسما همراه هستند که با آسیب ورزشی و کاهش عملکرد همراه خواهند بود (۲۶). مشخص شده است که هر دو مکمل‌سازی کوتاه و طولانی مدت گلوتامین دارای اثرات نیروافزایی روی توده عضلانی یا عملکرد عضلانی نیستند (۲۷). مشخص شده است که فعالیت ورزشی سنگین که با انقباض های شدید همراه با اضافه بارهای شدید همراه است موجودیت گلوتامین را کاهش می‌دهد (۲۳). مکمل‌سازی گلوتامین با منظور به حداقل رساندن موجودیت آن در پلاسما انجام می‌گیرد. برخی محققان نیز مکمل سازی گلوتامین را به جهت کاهش آسیب‌های عضلانی ناشی از انقباض‌های شدید عضلانی توصیه نموده‌اند (۱۰).

از سوی دیگر, تمرینات ورزشی موجب آسیب‌های ریز عضلانی می‌شود که طبعاً با فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای و به تبع آن افزایش بیان ژن MyoD همراه است؛ اما پاسخ ژن MyoD به فعالیت‌های بدنی متناقض است (۲۲). تمریناتی که موجب آسیب عضلانی شدند، بیان ژن MyoD را به طور چشمگیری تحت تأثیر قرار ندادند (۷). برای مثال در مدل‌های حیوانی (رت‌ها) مشاهده شد که یک جلسه تمرین تردمیل فزاینده با شیب منفی (القا کننده‌ی آسیب عضلانی) بر بیان mRNA MyoD عضلات نعلی و بازکننده اثر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

معناداری ندارد (۲۳). هر چند گزارش شده که بازسازی عضلات آسیب دیده‌ی نعلی رت‌ها با فعالیت‌های ورزشی (فعالیت های شدید و اختیاری) تشدید می‌شود که این موضوع با افزایش مقدار پروتئین MyoD همراه بود (۱۱). افزایش بیان ژن MyoD نشانه‌ی تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای است و تکثیر این سلول‌ها زمانی بیشتر می‌شود که آسیب (فارماکولوژی، پاتولوژی، یا فعالیت‌های قدرتی) عضلانی رخ دهد (۱۴). در رابطه با تأثیر شدت، نوع فعالیت ورزشی و تاثیر آن در سازگاری متابولیکی، به نظر می‌رسد که در بافت عضله (تند انقباض)؛ اجرای فعالیت مقاومتی شدید باعث ایجاد تغییراتی در میزان بیان ژن MyoD شده و بیان این ژن را افزایش داده است. گر چه به نظر می‌رسد که در بافت عضله (تند انقباض)، گاواژ روزانه یک وعده مکمل‌های ارگانیک (اسپیرولینا و غیرارگانیک گلوتامین باعث ایجاد تغییراتی در میزان بیان ژن myoD شده و بیان این ژن را افزایش داده است. در نتیجه نوع و میزان مصرف مکمل در میزان بیان پاسخ‌های بیان ژن MyoD متفاوت است و این نتایج می‌تواند ناشی از بروز آسیب‌های احتمالی پس از ورزش مقاومتی با شدت بالا در تارهای تند انقباض بوده یا می‌تواند نشانه بروز یک پاسخ در راستای ایجاد سازگاری‌های مرتبط با اجرای تمرینات مقاومتی در این گونه تارهاش تند انقباض باشد (۱۰).

نتیجه‌گیری

ورزش مقاومتی شدید موجب فراخوانی عضلات تند انقباض، باعث تاثیر روی میزان بیان ژن myoD می‌شود. مصرف مکمل‌ها شیوه مناسب در مهار عوارض ناشی از فعالیت بدنی سنگین می‌باشد.

References

1. Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. J Clin Diagn Res. 2013 Aug;7(8):1764-6.

2. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, et al. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. Atherosclerosis. 2003 Apr;167(2):327-34.

3. Accattato F, Greco M, Pullano SA, Carè I, Fiorillo AS, Pujia A, et al. Effects of acute physical exercise on oxidative stress and inflammatory status in young, sedentary obese subjects. PLoS One. 2017 Jun 5;12(6):e0178900.

4. Padilha CS, Borges FH, Costa Mendes da Silva LE, Frajacomo FTT, Jordao AA, Duarte JA, et al. Resistance exercise attenuates skeletal muscle oxidative stress, systemic pro-inflammatory state, and cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2017 Sep;42(9):916-923.

5. Britto FA, Gnimassou O, De Groote E, Balan E, Warnier G, Everard A, et al. Acute environmental hypoxia potentiates satellite cell-dependent myogenesis in response to resistance exercise through the inflammation pathway in human. FASEB J. 2020 Jan;34(1):1885-1900.

6. Rasouli SH, Farzanegi P, Abbaszadeh H. The effect of aerobic training and hyaluronic acid on expression of MYOD and MURF-1 genes in experimental arthritis model rats. Razi Journal of Medical Sciences, 2021; 28(3): 48-58.(Persian)

7. Luk HY, Levitt DE, Boyett JC, Rojas S, Flader SM, McFarlin BK, et al. Resistance exercise-induced hormonal response promotes satellite cell proliferation in untrained men but not in women. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019 Aug 1;317(2):E421-E432.

8. Layne AS, Larkin-Kaiser K, MacNeil RG, Dirain M, Sandesara B, Manini TM, et al. Effects of blood-flow restriction on biomarkers of myogenesis in response to resistance exercise. Appl Physiol Nutr Metab. 2017 Jan;42(1):89-92.

9. Jang J, Park S, Kim Y, Jung J, Lee J, Chang Y, et al. Myostatin Inhibition-Induced Increase in Muscle Mass and Strength Was Amplified by Resistance Exercise Training, and Dietary Essential Amino Acids Improved Muscle Quality in Mice. Nutrients. 2021 Apr 29;13(5):1508.

10. Morais SRL, Brito VGB, Mello WG, Oliveira SHP. l-arginine modulates inflammation and muscle regulatory genes after a single session of resistance exercise in rats. Scand J Med Sci Sports. 2018 Feb;28(2):425-435.

11. Oliveira AA, Martins FM, FURLANETTO JR, Michelin MA. Rheumatoid arthritis-increased gene expressions in muscle atrophy are restored back to control as a response to acute resistance exercise. Rev. bras. ciênc. mov, 2018: p. 24-33.

12. Bechshøft CJL, Jensen SM, Schjerling P, Andersen JL, Svensson RB, Eriksen CS, et al. Age and prior exercise in vivo determine the subsequent in vitro molecular profile of myoblasts and nonmyogenic cells derived from human skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2019 Jun 1;316(6):C898-C912.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

13. Sailani MR, Halling JF, Møller HD, Lee H,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]

Plomgaard P, et al. Lifelong physical activity is associated with promoter hypomethylation of genes involved in metabolism, myogenesis, contractile properties and oxidative stress resistance in aged human skeletal muscle. Sci Rep. 2019 Mar 1;9(1):3272.

14. Peake JM, Markworth JF, Cumming KT, Aas SN, Roberts LA, Raastad T, et al. The effects of cold water immersion and active recovery on molecular factors that regulate growth and remodeling of skeletal muscle after resistance exercise. Front Physiol. 2020 Jun 30;11:737.

15. Shanthi G, Premalatha M, Anantharaman N. Effects of L-amino acids as organic nitrogen source on the growth rate, biochemical composition and polyphenol content of Spirulina platensis. Algal res, 2018. 35: 471-478.

16. Choi Y, Lee SY. Biosynthesis of inorganic nanomaterials using microbial cells and bacteriophages. Nat. Rev. Chem. 2020 Dec;4(12):638-56.

17. Iqbal P, Ghani MA, Ali B, Shahid M, Iqbal Q, Ziaf K, et al. Exogenous application of glutamic acid promotes cucumber (Cucumis sativus L.) growth under salt stress conditions. EJFA. 2021 Jul 28:407-16.

18. Bhardwaj AK, Naraian R. Cyanobacteria as biochemical energy source for the synthesis of inorganic nanoparticles, mechanism and potential applications: a review. 3 Biotech. 2021 Oct;11(10):1-6.

19. Hassan F, Mobarez S, Mohamed M, Attia Y, Mekawy A, Mahrose K. Zinc and/or Selenium Enriched Spirulina as Antioxidants in Growing Rabbit Diets to Alleviate the Deleterious Impacts of Heat Stress during Summer Season. Animals (Basel). 2021 Mar 10;11(3):756.

20. Nasrollahzadeh M, Sajjadi M, Iravani S, Varma RS. Green - synthesized nanocatalysts and nanomaterials for water treatment: Current challenges and future perspectives. J Hazard Mater. 2021 Jan 5;401:123401.

21. Godfrey JK, Kayser BD, Gomez GV, Bennett J, Jaque SV, Sumida KD. Interrupted resistance training and BMD in growing rats. Int J Sports Med. 2009 Aug;30(8):579-84.

22. Kemmler W, Kohl M, Fröhlich M, Schoene D, von Stengel S. Detraining effects after 18 months of high intensity resistance training on osteosarcopenia in older men-Six-month follow-up of the randomized controlled Franconian Osteopenia and Sarcopenia Trial (FrOST). Bone. 2021 Jan;142:115772.

23. Hemati Farsani Z, Banitalebi E, Faramarzi M, Bigham-Sadegh A. The Effect of Eight Weeks of Moderate and High Intensity Endurance Training On Biomechanical Properties of Femur in Old Male Wistar Rats. Iranian Journal of Orthopaedic Surgery, 2018; 16(2): 249-258. (Persian)

24. Farsani ZH, Banitalebi E, Faramarzi M, Bigham-Sadegh A. Effects of different intensities of strength and endurance training on some osteometabolic miRNAs, Runx2 and PPARγ in bone marrow of old male wistar rats. Mol Biol Rep. 2019 Apr;46(2):2513-2521.

25. Jafarzadeh G, Shakerian S, Farbood Y, Ghanbarzadeh M. Effects of Eight Weeks of Resistance Exercises on Neurotrophins and Trk Receptors in Alzheimer Model Male Wistar Rats. Basic Clin Neurosci. 2021 May-Jun;12(3):349-359.

26. Bourzac C, Bensidhoum M, Manassero M, Chappard C, Michoux N, Pallu S, et al. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using µCT. Life (Basel). 2020 Nov 24;10(12):308.

27. Bosiacki M, Gutowska I, Piotrowska K, Lubkowska A. Concentrations of Ca, Mg, P, Prostaglandin E2 in Bones and Parathyroid Hormone; 1,25-dihydroxyvitamin D3; 17-β-estradiol; Testosterone and Somatotropin in Plasma of Aging Rats Subjected to Physical Training in Cold Water. Biomolecules. 2021 Apr 21;11(5):616.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.27.3]