

Article Type:
Research Article

Article History:

Received: 2024/11/30
Revised: 2025/4/12
Accepted: 2025/4/19
Published: 2025/6/22

How to Cite:

Shamsi B, Saremi A, Malekipooya M. Expression of myostatin and follistatin genes in hypothyroid rats following a moderate-intensity exercise period. *EBNESINA* 2025;27(2):25-36.
DOI: 10.22034/27.2.25

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, Arak University, Arak, Iran
2. Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Arak Branch, Arak, Iran

✉ Corresponding Author:

Abbas Saremi

Address: Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, Arak University, Arak, Iran
Tel: +98 (86) 33412175
E-mail: a-saremi@araku.ac.ir



Aja University of Medical Sciences

EBNESINA

journal homepage: <https://ebnesina.ajaums.ac.ir>

ISSN: 1735-9503
eISSN: 4653-2645



Expression of myostatin and follistatin genes in hypothyroid rats following a moderate-intensity exercise period

Behnam Shamsi¹, Abbas Saremi^{1✉}, Mohammad Malekipooya²

Abstract

Background and aims: Hypothyroidism leads to a reduction in muscle volume and mass. Meanwhile, the myostatin and follistatin genes play a pivotal role in regulating muscle growth, homeostasis, and preventing atrophy. This study investigated the expression of these genes in response to a moderate-intensity exercise program in rats with hypothyroidism.

Methods: In this controlled experimental study, 21 male Wistar rats (8 weeks old, weighing 210 ± 15 g) were induced with hypothyroidism (150 mg/kg) and randomly divided into three groups: healthy, hypothyroidism control, and hypothyroidism + endurance training. The intervention group underwent a 6-week endurance training program (speed: 10–20 m/min, duration: 20–40 min). After training and anesthesia, tissue samples were collected, and gene expression was measured using Real-Time PCR. Data were analyzed using a one-way ANOVA test (significance level: $p < 0.05$) and GraphPad software.

Results: Hypothyroidism induction significantly increased myostatin levels ($p < 0.0001$) and also decreased follistatin levels ($p = 0.353$) in rats. However, endurance training significantly reduced myostatin ($p < 0.0001$) and increased follistatin levels ($p = 0.01$) in hypothyroid rats.

Conclusion: Endurance training appears to counteract muscle atrophy and wasting in hypothyroid rats by inducing beneficial changes in the expression of the studied genes.

Keywords: Hypothyroidism, Exercise, Myostatin, Follistatin

EBNESINA - IRIAF Health Administration

(Vol. 27, No. 2, Serial 91)



Copyright© 2025. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: <http://www.ebnesina.ajaums.ac.ir>

Introduction

Hypothyroidism (HO) stands as one of the most prevalent endocrine disorders, characterized by diminished thyroid hormone levels. The etiology of this condition is multifaceted, with contributing factors including autoimmune thyroiditis, iodine deficiency, surgical interventions, or radioiodine therapy [1]. A mild form of hypothyroidism is identified when thyroxine (T4) levels remain within the normal range, while thyroid-stimulating hormone (TSH) levels are elevated but remain below 10 mIU/L [3]. The interplay between thyroid hormones, TSH levels, and muscle structure is well-documented, underscoring the critical role of thyroid hormones (THs) as regulators of muscle metabolism in both health and disease. These hormones function as potent anabolic and catabolic agents, making their investigation pivotal in understanding muscle function [5].

Previous research has explored the effects of exercise training on myostatin and follistatin levels, revealing no significant alterations in these markers across various training sessions [17]. Given this context, the present study sought to elucidate the changes in myostatin and follistatin gene expression following a regimen of moderate-intensity exercise (MIT) in rats with induced hypothyroidism. This investigation aimed to address a potential gap in the literature by examining how exercise influences these molecular markers in a hypothyroid state.

Methods

The study employed 21 male Wistar rats, aged eight weeks, with an average weight of 210 ± 15 grams. After acclimatization to the laboratory environment, the animals were randomly allocated into three groups of seven: a healthy control group (H), a hypothyroid control group (HO), and a hypothyroid group subjected to endurance exercise (HO+EX). Hypothyroidism was induced via intraperitoneal injection of methimazole powder over a 10-day period [18]. The endurance exercise protocol was conducted over six weeks,

with sessions occurring five days per week [22].

Two days after the completion of the exercise protocol, the rats were anesthetized and euthanized using an intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) to facilitate the extraction of muscle tissue. RNA and cDNA were subsequently isolated from the muscle samples, and quantitative gene expression analysis was performed using PCR with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The Shapiro-Wilk test was employed to assess the normal distribution of the data. Statistical comparisons between groups were conducted using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test for pairwise comparisons.

Results

The findings revealed that the induction of hypothyroidism resulted in a significant increase in myostatin levels ($p < 0.0001$) and a non-significant decrease in follistatin levels ($p = 0.353$) among the rats. Conversely, endurance training led to a marked reduction in myostatin levels ($p < 0.0001$) and a significant elevation in follistatin levels ($p = 0.01$) in the hypothyroid rats. These results suggest that moderate-intensity exercise exerts a regulatory effect on the expression of these genes in the context of hypothyroidism.

Discussion and Conclusion

The key outcomes of this study include a substantial reduction in myostatin gene expression and a notable increase in follistatin gene expression compared to the hypothyroid control group. These findings align with prior research by Carneiro et al., who identified myostatin as a critical regulator of muscle growth. Their work demonstrated that hypothyroid patients exhibit elevated myostatin expression, which correlates with muscle atrophy [10]. This underscores the therapeutic potential of physical activity in mitigating muscle deterioration in hypothyroid individuals.

Further supporting these observations, Rashidlamir et al. investigated the impact of endurance training on myostatin protein expression in cardiac muscle and reported a significant decline in myostatin levels post-exercise [24]. Similarly, Asad et al. observed a reduction in myostatin concentration following a combined exercise program in non-athletic men [26]. Mechanistically, myostatin is known to inhibit skeletal muscle growth by activating the MSTN/SMAD signaling pathway [28].

The study also highlighted the role of follistatin, which exhibited a significant increase in expression following endurance training. This finding is consistent with the work of Karimi et al., who documented elevated follistatin gene expression in response to exercise [34]. Additionally, Elliott et al. reported a rise in follistatin levels among non-athletic elderly participants after high-intensity exercise training [35]. Hansen et al. further demonstrated that plasma follistatin secretion increases during physical activities such as cycling, knee bending, and swimming [36]. Follistatin appears to function by inhibiting activin and attenuating myostatin signaling, positioning it as a promising therapeutic target for muscle growth regulation, metabolic syndrome, and inflammation.

In conclusion, the study demonstrates that moderate-intensity endurance training induces favorable changes in myostatin and follistatin

gene expression in hypothyroid rats. These molecular adaptations suggest that exercise may serve as a viable intervention to counteract muscle atrophy and wasting in hypothyroid individuals.

Ethical Considerations

This study received approval from the Ethics Committee for Biomedical Research at Islamic Azad University, Arak Branch, under the ethics code IR.IAU.ARAK.REC.1403.273. All procedures adhered to ethical guidelines to ensure the humane treatment of the animals involved.

Funding

There is no funding support.

Authors' Contribution

Authors contributed equally to the conceptualization and writing of the article. All of the authors approved the content of the manuscript and agreed on all aspects of the work.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to all those who contributed to this research project. This article is the result of the first author's postdoctoral research project.

بیان ژن‌های میواستاتین و فول‌استاتین موش‌های صحرایی مبتلا به هیپوتیروئیدی متعاقب یک دوره تمرین با شدت متوسط

بهنام شمسی^۱، عباس صارمی^۱✉، محمد ملکی پویا^۲

چکیده

زمینه و اهداف: بیماری هیپوتیروئیدی منجر به کاهش حجم و توده بافت عضلات می‌شود. از طرفی نقش کلیدی ژن‌های میواستاتین و فول‌استاتین در تنظیم رشد و هموستاز عضلانی و جلوگیری از آتروفی بسیار ضروری است. از این رو تحقیق فوق به بررسی بیان ژن‌های فوق متعاقب یک برنامه تمرینی با شدت متوسط بر موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری هیپوتیروئیدی پرداخته است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی کنترل شده با گروه شاهد ۲۱ سر موش صحرایی نر ویستار (۸ هفته‌ای با وزن 210 ± 15 گرم) پس از القاء هیپوتیروئیدی (۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به‌طور تصادفی به سه گروه ۷ تایی سالم، کنترل-هیپوتیروئیدی و تمرین استقامتی-هیپوتیروئیدی تقسیم شدند. گروه‌های پژوهش برای یک دوره ۶ هفته‌ای تحت فعالیت ورزشی استقامتی (با سرعت ۱۰ تا ۲۰ متر/دقیقه و مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه) قرار گرفتند. پس از تمرین و بی‌هوشی، نمونه‌برداری بافتی صورت گرفت و بعد از انجام فرایندهای ملکولی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه ریل‌تایم اندازه‌گیری شد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ و نرم‌افزار گراف‌پد استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد القاء بیماری هیپوتیروئیدی منجر به افزایش معنی‌دار میواستاتین ($p < 0.0001$) و کاهش فول‌استاتین موش‌های صحرایی شد ($p = 0.035$). همچنین انجام تمرین استقامتی باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.0001$) میواستاتین و افزایش معنی‌دار سطوح فول‌استاتین ($p = 0.01$) موش‌های صحرایی هیپوتیروئیدی شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرینات استقامتی با ایجاد تغییرات سازنده و مثبت بر ژن‌های مورد مطالعه بیماران هیپوتیروئیدی از آتروفی و تحلیل عضلانی آن‌ها جلوگیری می‌کند.

کلمات کلیدی: هیپوتیروئیدی، تمرین استقامتی، میواستاتین، فول‌استاتین

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۲-گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

✉نویسنده مسئول: عباس صارمی
آدرس: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران
تلفن: ۳۳۴۱۲۱۷۵ (۸۶) ۰۹۸
ایمیل: a-saremi@araku.ac.ir

مقدمه

هیپوتیروئیدی از مهمترین اختلالات شایع غدد درون ریز است. در این بیماری سطوح هورمون تیروئید کاهش می یابد و عواملی مانند تیروئیدیت خود ایمنی، کمبود ید، جراحی یا درمان با ید رادیویی در شیوع آن می تواند تأثیر گذار باشد [۱]. بیش از ۳۰٪ از جمعیت جهان در مناطقی با کمبود ید مواجهه هستند. به ویژه در شمال و شرق آسیا، در معرض خطر ابتلا به کم کاری تیروئید بیشتری نسبت به دیگر نواحی به دلیل کمبود ید قرار دارند [۱]. در مطالعات مختلف شیوع هیپوتیروئیدی تحت بالینی را بین ۱۰ تا ۴۰٪ گزارش می کنند و این اختلاف در شیوع وابسته به نژاد، جغرافیای محل زندگی، جنسیت (در زنان)، سن (در افراد مسن) و رنگ پوست (در افراد سفید) هستند [۲].

کم کاری خفیف غده تیروئید زمانی مطرح است که هورمون تیروکسین در حد طبیعی باشد. اما هورمون محرک تیروئید (TSH)^۱ بالاتر از حد طبیعی و کمتر از ۱۰ میلی واحد/لیتر ترشح شود [۳]. از سوی دیگر اکثر محققین به این باور هستند که بالا بودن TSH با اضافه وزن و بیماری چاقی در ارتباط است. چاقی منشاء بسیاری از بیماری ها از قبیل فشار خون، آترواسکلروز، دیابت نوع دو، انواع خاصی از سرطان، اختلالات گوارشی و تنفسی است [۴]. از طرفی بین هورمون تیروئید و مقادیر TSH و ساختار عضلانی نیز ارتباط مستقیمی وجود دارد. هورمون های تیروئید تنظیم کننده های حیاتی متابولیسم عضلانی در شرایط سلامت و بیماری بوده و همزمان به عنوان آنابولیک و کاتابولیک قدرتمند عمل می کنند. همچنین این هورمون ها نقش حیاتی در نگهداری توده عضلانی به همراه داشته و اختلالات آن علت اصلی طیف گسترده ای از پاتولوژی عضلانی در سطح جهان با عنوان میوپاتی است. از طرفی هیپوتیروئیدی به دلیل تغییر تعادل بین سنتز و تجزیه پروتئین عضلانی بر فیزیولوژی عضله تأثیر منفی گذاشته و منجر به ضعف و خستگی عضلانی می شود [۵].

هیپوتیروئیدی تحت بالینی به عنوان یک عامل ریسک برای بروز عوارض کم کاری تیروئید آشکار محسوب می شود. با توجه به اینکه تیروئید روی تمام جنبه های متابولیسم اثر می گذارند. درمان این افراد قبل از مشاهده علائم بالینی در الویت درمانی است [۶]. از رویکردهای مهم هورمون های تیروئید تنظیم مثبت رشد عضلات است. اما از سوی دیگر در طول کم کاری و پرکاری تیروئید، اثر کاتابولیک عمیقی بر عضلات اسکلتی ایجاد می گردد. آتروفی عضلانی مرتبط با پرکاری تیروئید نتیجه افزایش سرعت تجزیه پروتئین بیش از افزایش سنتز آن است. در مقابل، کم کاری تیروئید با کاهش سنتز پروتئین و افزایش تجزیه پروتئین باعث آتروفی عضلانی می گردد [۷]. از آنجایی که ناحیه پروموتور میواستاتین^۲ حاوی چندین عامل احتمالی پاسخ هورمون تیروئید است. این فرض وجود دارد که هورمون های تیروئیدی بر بیان ژن میواستاتین و فول استاتین^۳ اثر گذار باشند [۸].

ژن میواستاتین با نام فاکتور رشد و تمایز (GDF-8)^۴ شناخته شده است. میو استاتین عضوی از خانواده TGF-β^۵ است که توسط سلول های میوسیت تولید و آزاد می شود. سپس وارد سلول های عضلانی و خون در بدن شده و از رشد عضلات جلوگیری می کند [۹]. در بیماران با کم کاری تیروئید مقادیر ژن میواستاتین افزایش می یابد [۱۰]. میو استاتین، در کنترل تشکیل تارهای عضلات نقش مهمی دارد و با مهار تکثیر میوبلاست ها، از رشد، هیپرتروفی و هیپرپلازی تارها جلوگیری می کند. این نشانگر در دوره های بی تمرینی در عضلات اسکلتی افزایش یافته و با مهار این پروتئین، قدرت و توده عضلانی افزایش پیدا می کند [۱۱]. از مهارکننده های مهمی که بیان میو استاتین را تحت تأثیر قرار می دهد فول استاتین است [۱۲]. فول استاتین به عنوان یک نشانگر دیگر در بررسی فوق مورد اندازه گیری قرار گرفته است.

2. Myostatin

3. Follistatin

4. Growth Differentiation Factor 8

5. Transforming growth factor beta

1. Thyroid Stimulating Hormone

روش بررسی

در این پژوهش تجربی کنترل شده با گروه شاهد از ۲۱ سر موش صحرایی نر ویستار ۸ هفته ای با میانگین وزنی 210 ± 15 گرم که از انستیتو پاستور خریداری شده بود، استفاده گردید. این حیوانات در قفس های پلی کربنات شفاف و در شرایط کنترل شده با دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت $50 \pm 5\%$ و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش های صحرایی نگهداری شدند. پس از انتقال حیوانات به محیط پژوهش به مدت یک هفته، در شرایط جدید نگه داری شدند و بعد از سازگاری با محیط آزمایشگاه به طور تصادفی به سه گروه هفت تایی سالم، کنترل (+هیپوتیروئیدی) و تمرین (+هیپوتیروئیدی) تقسیم شدند.

در این پژوهش هیپوتیروئیدی از طریق تزریق داخل صفاقی پودر متی مازول (MMI شرکت ایران هورمون) با دوز شش میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن حل شده در سالین به مدت ۱۰ روز سبب القا کم کاری تیروئیدی شد [۱۸]. متی مازول از خانواده داروهای آنتی تیروئیدی، کلاس تیونامیدها است و برای کنترل و درمان هیپرتیروئیدیسم به کار می رود. متی مازول، سنتز هورمون های تیروئیدی را در غده تیروئید مهار و از تشکیل هورمون های آن از یدورها و تیروزین جلوگیری می کند. بخشی از مکانیسم عمل این دارو، مهار آنزیم تیروئید پراکسیداز است که برای یددار شدن تیروزین، ضروری است و بخشی دیگر جلوگیری از مزدوج شدن دو تیروزین یددار برای تشکیل تری یدوتیرونین است [۱۹].

مرحله آشناسازی موش های صحرایی با تردمیل در هفته دوم، به مدت یک هفته، هفته ای پنج روز، هر روز به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر/دقیقه انجام شد. موش های صحرایی برای دویدن از طریق صدا و تحریک شرطی سازی شدند تا از نزدیک شدن، استراحت و برخورد با بخش شوک الکتریکی در بخش انتهایی دستگاه خودداری کنند [۲۰، ۲۱]. پس از سازگاری، القاء هیپوتیروئیدی و آشناسازی با تردمیل، تمرین ابتدا به مدت پنج دقیقه و با سرعت ۱۰ متر/دقیقه و با شیب

این ژن یک پروتئین پلاسمای گلیکوزیله و عضوی از خانواده TGF- β است در بافت های مختلفی مانند ماهیچه های اسکلتی، جفت، تخمدان و بیضه ترشح می شود [۱۳]. این پروتئین به عنوان آنتاگونیست میواستاتین عمل می کند و افزایش بیان آن موجب افزایش حجم و قدرت عضله می شود [۱۴].

علاوه بر درمان های پزشکی به شیوه دارویی در این گونه از بیماران روش های متفاوت دیگری در طب مکمل در مواجهه با عوارض تیروئیدی وجود دارد. از جمله رویکردهای درمانی غیردارویی بیماران فوق حتی پس از ابتلا به این بیماری می توان به فعالیت بدنی به عنوان یک عنصر توانبخشی اشاره نمود. انجام تمرینات هوازی منظم به عنوان یک برنامه درمانی به ویژه در درمان بیماری های مانند آن مورد بحث است. در همین راستا اسد و همکاران نشان دادند مقدار میو استاتین در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل، متعاقب برنامه تمرین بدنی کاهش معنی داری داشته است [۱۵]. اما در پژوهش دیگر نتایج نشان داد که غلظت میو استاتین و فول استاتین بین سه گروه تمرینی تفاوت معنی داری به همراه نداشت [۱۶]. همچنین باقری و همکاران در بررسی تأثیر تمرینات ورزشی بر سطوح میو استاتین و فول استاتین، نشان دادند که میزان این دو شاخص در تمرینات متفاوت، تغییر معنی داری نشان نداد [۱۷]. با توجه به نتایج پژوهش های فوق و اهمیت توجه به سبک زندگی فعال در راستای کاهش خطر بیماری های قلبی، مقاومت به انسولین و تجزیه پروتئین نتایج این مطالعه از ضرورت خاصی برخوردار است. بنابراین درک جامع از گردش پروتئین ماهیچه اسکلتی وابسته به هورمون های تیروئید ممکن است در اصلاح ضعف فیزیکی و تسهیل سنتز نشانگرهای مرتبط برای این بیماران مفید باشد. از این رو پژوهش حاضر با هدف تعیین تغییرات بیان ژن میو استاتین و فول استاتین متعاقب یک دوره تمرینات با شدت متوسط^۱ بر موش های صحرایی مبتلا به هیپوتیروئیدی انجام شد.

1. Moderate Intensity Training

جدول ۱- برنامه تمرین استقامتی

هفته	سرعت (متر بر دقیقه)	زمان (دقیقه)	تعداد (جلسه در هفته)	شیب (درجه)
اول	۱۰	۲۰	۵	صفر
دوم	۱۰	۲۰	۵	۵
سوم	۲۰	۳۰	۵	۵
چهارم تا ششم	۲۰	۴۰	۵	۵

صفر درجه شروع شد. تمرین استقامتی روی نوارگردان برای شش هفته، پنج روز/هفته، هر جلسه به مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ تا ۲۰ متر/دقیقه همانند **جدول ۱** انجام شد. در پایان جلسه تمرینی مدت پنج دقیقه و با سرعت ۱۰ متر/دقیقه عمل سرد کردن برای موش‌ها انجام گرفت [۲۲].

جهت استخراج بافت گروه‌ها دو روز پس از پایان پروتکل تمرین و تحریک با ترکیبی از کتامین (۷۵ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) به روش درون صفاقی بی‌هوش و کشته شدند. نمونه بافت تحقیقی از بافت عضلانی پشت ساق موش‌های صحرایی برداشته و با استفاده از محلول بافر فسفات سالین شستشو شد. سپس بلافاصله در ازلت مایع منجمد گردید و تا زمان استخراج RNA به فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد انتقال داده شد. در ادامه برای استخراج RNA و ارزیابی ملکولی ابتدا بافت‌ها از فریزر خارج و کوبیده شد. به پودر ناشی از بافت هموژن ۷۰۰ میکرولیتر بافر محلول و ۳/۵ میکرولیتر محلول بتامرکاپتواتانول (β -ME) مرک آلمان) اضافه و نمونه‌ها برای یک دقیقه ورتکس شدند. در ادامه به نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (TCM مرک آلمان) اضافه گردید و ۳۰ ثانیه ورتکس مجدد انجام شد. سپس میکروتیوب‌های حاوی ترکیبات فوق برای ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و در سانتریفوژ (سیگما آمریکا) برای ۱۰ دقیقه با ۱۱ هزار دور/دقیقه قرارداده شد. در ادامه ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی محلول به یک میکروتیوب جدید انتقال داده و با ۴۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق (EA مرک آلمان) میکس گردید و مجدد سانتریفوژ انجام شد. پس از خروج محلول داخلی کلکتور، عمل واشینگ برای دو بار تکرار گردید و سانتریفوژ شد. ستون استخراج شده به یک میکروتیوب جدید انتقال و با محلول ۵۰ میکرولیتر ایلوشن بافر (BS سیگما الدریج آلمان) ترکیب گردید. محلول حاصل سانتریفوژ شده و سپس RNA استخراج و در

یخچال برای مراحل دیگر نگهداری شد. در نهایت استخراج cDNA مطابق پروتکل شرکت سازنده^۱ به ازای استخراج هر RNA یک میکروتیوب جدید صورت پذیرفت. بر حسب میکروتیوب‌های حاوی RNA معادل یک نانوگرم ترکیب بافر ۱۰ میکرولیتر و دو میکرولیتر آنزیم اضافه گردید تا حجم نهایی با افزودن آب دیپس^۲ به ۲۰ میکرولیتر افزایش یابد. سپس میکروتیوب‌های حاوی ترکیبات فوق به مدت زمان ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۷ درجه سانتی گراد و در نهایت پنج دقیقه در ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در انتها نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ (سونی ۲۰۴۸) از نظر کمی و کیفی بررسی و همچنین کیفیت DNA نمونه‌ها نیز بر روی ژل الکتروفورز بارگیری و مورد بررسی قرار گرفت. در پایان کار واکنش زنجیره پلی‌مراز PCR با استفاده از دستگاه لایوتکنولوژی آمریکا و مواد اولیه شرکت کایژن در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اراک انجام گردید. در همین راستا مقدار ۶/۵ میکرولیتر آب دیپس، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر روکس، دو میکرولیتر پرایمر پیش‌رو و معکوس با یک میکرولیتر cDNA ترکیب گردید تا یک محلول ۲۰ میکرولیتری تشکیل گردد. این ترکیب در دستگاه real-time با دما و سیکل‌های متفاوت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی پرایمرها نیز از پایگاه داده‌های مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)^۳ تهیه و سپس طراحی پرایمرهای هر دو ژن با استفاده از برنامه پرایمر مورد بررسی قرار گرفت که در **جدول ۲** آمده است.

ملاحظات اخلاقی

در کلیه مراحل مختلف پژوهش ضمن رعایت مسائل اخلاقی سعی شد از هر گونه آزار جسمی و روش‌های غیرضروری اجتناب شود.

1. Fermentas, K1622, USA

2. DEPC-treated water (Diethylpyrocarbonate)

3. National Center for Biotechnology Information

کاهش معنی داری بین گروه کنترل و تمرین استقامتی را نشان داد ($F=121$ و $p<0.001$). همچنین آزمون تعقیبی توکی کاهش معنی داری بین تمرین استقامتی و گروه سالم نشان داد ($F=8/5$ و $p<0.001$) (جدول ۳ و نمودار ۱).

آمار توصیفی و تحلیلی سطوح فول استاتین با توجه به مداخله تمرین استقامتی در جدول ۴ ارائه شده است. همچنین نمودار ۲ مقدار بیان ژن فول استاتین در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج بیان کرد القاء هیپوتیروئیدی منجر به کاهش غیرمعنی دار بیان ژن فول استاتین نسبت به گروه کنترل شد ($F=2$ و $p=0.353$). نتایج آزمون آنوا یک طرفه افزایش معنی داری بین تمرین استقامتی با گروه سالم ($F=3/9$ و $p=0.032$) و همچنین تمرین استقامتی با گروه کنترل را نشان داد ($F=5/9$ و $p=0.001$) (جدول ۴ و نمودار ۲).

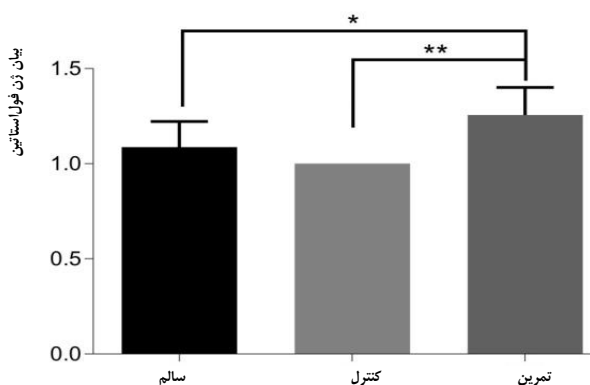
بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر به بررسی تأثیر یک دوره تمرین با شدت متوسط بر بیان ژن میواستاتین و فول استاتین موش‌های صحرایی نر مبتلا به هیپوتیروئیدی پرداخت. از یافته‌های مهم این پژوهش می‌توان به کاهش معنی دار سطوح ژن میواستاتین در گروه تمرین و افزایش معنی دار بیان ژن فول استاتین نسبت به گروه کنترل اشاره نمود.

جدول ۴- مقایسه بیان ژن فول استاتین در گروه‌های مختلف

گروه‌های مقایسه	اختلاف میانگین (SE±)	مقدار F	مقدار p
کنترل با سالم	-0.08 ± 0.06	2	0.353*
سالم با تمرین	-0.16 ± 0.06	3/9	0.032*
کنترل با تمرین	-0.25 ± 0.06	5/9	0.001**

* و ** تفاوت معنی دار بین گروه‌ها



* و ** تفاوت معنی دار بین گروه‌ها

جدول ۲- پرایمرهای به کار رفته در PCR

نام ژن	توالی پرایمرها
MSTN	پیش‌رو: 5'-CTACCACGGAAACAATCATT-3'
	معکوس: 5'-AGCAACATTGGGCTTTCCAT-3'
FST	پیش‌رو: 5'-GCTCTCTCCCAGGTCACATT-3'
	معکوس: 5'-GACTCATCCAGTAGACCACA-3'
HKG	باز ۱۶: CCCAAGCCGCATTTT
	باز ۱۶: CCCAAGCCGCATTTT

HKG: Housekeeping Gene

تجزیه و تحلیل آماری

بیان کمی نتایج ژن‌ها با روش $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ انجام شد و توزیع نرمال آنها با آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. مقایسه میانگین بین گروه‌ها، با آنالیز تحلیل واریانس (آنووا) یک طرفه و تعقیبی توکی انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار آماری گراف پد (نسخه ۶) در سطح معنی داری $p<0.05$ و سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

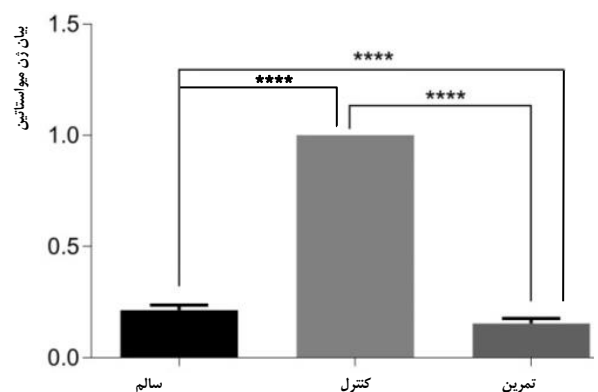
یافته‌ها

آمار توصیفی و تحلیلی سطوح میو استاتین با توجه به مداخله تمرین استقامتی در جدول ۳ ارائه شده است. همچنین نمودار ۱ مقدار بیان ژن میو استاتین در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج بیان کرد القاء هیپوتیروئیدی منجر به افزایش معنی دار بیان ژن میو استاتین کنترل نسبت به گروه سالم شد ($F=112$ و $p<0.001$). نتایج آزمون آنوا یک طرفه

جدول ۳- مقایسه بیان ژن میو استاتین در گروه‌های مختلف

گروه‌های مقایسه	اختلاف میانگین (SE±)	مقدار F	مقدار p
کنترل با سالم	-0.78 ± 0.09	112	$<0.001^*$
سالم با تمرین	0.05 ± 0.09	8/5	$<0.001^*$
کنترل با تمرین	-0.84 ± 0.09	121	$<0.001^*$

* تفاوت معنی دار بین گروه‌ها



**** تفاوت معنی دار بین گروه‌ها

کارنیرو^۱ و همکاران گزارش کردند ژن میواستاتین یکی از عوامل تنظیم کننده مهم در رشد عضله است. در بیماران با کم کاری تیروئید بیان این ژن افزایش یافته و به دنبال آن آتروفی عضلانی ایجاد می شود [۱۰]. در مقابل افزایش قابل توجهی در سطوح هورمون های مانند تری-یدوتیرونین، تترایدوتیرونین و هورمون آزاد کنند تیروئید متعاقب تمرین هوازی گزارش شده است [۲۳]. از این رو انجام فعالیت بدنی برای این بیماران جهت کنترل و بازتوانی بسیار مهم و ضروری است. همچنین رشیدلمیر و همکاران که در پژوهش خود به بررسی تأثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن پروتئین میواستاتین عضله قلب پرداخته بوند، کاهش معنی داری بیان ژن پروتئین میواستاتین را به دنبال فعالیت بدنی نشان دادند [۲۴]. در تحقیق همسوی دیگر جوکار و همکارانش نشان دادند تمرینات هوازی منجر به کاهش معنی دار محتوای میواستاتین بیماران دیابتی شد [۲۵]. همچنین اسد و همکاران در پژوهشی دیگر نشان دادند غلظت میواستاتین در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل متعاقب یک برنامه تمرینی ترکیبی در مردان غیر ورزشکار کاهش معنی داری را به همراه دارد [۲۶] که با نتایج گزارش هیتل^۲ و همکاران در خصوص کاهش معنی دار محتوای پروتئین میواستاتین با کاهش مقاومت به انسولین در بیماران دیابتی به دنبال تمرین هوازی بود [۲۷]. اما نتایج پژوهش عیسی زاده و همکاران که به بررسی تأثیر تمرینات ترکیبی بر سطوح سرمی میواستاتین و فول استاتین زنان سالمند پرداخته بودند در مقادیر میواستاتین و فول استاتین آزمودنی ها تغییرات معنی داری نشان نداد [۱۶]. نتایج تحقیقات بیان شده همسو با کاهش مقدار ژن میواستاتین در تحقیق حاضر است. در تضاد با پژوهش حاضر، ویلوگی^۳ و همکاران نشان دادند سطوح میواستاتین نمونه ها به دنبال یک برنامه تمرینی مقاومتی سه ماهه افزایش از خود نشان داد [۱۲]. از دلایل این تناقض می توان به

تمرینات مقاومتی سنگین، نمونه های تحقیقی سالم و طول مدت نسبت به تحقیق فوق اشاره نمود. فاکتورهای زیادی در رشد پروتئین های، افزایش حجم و تعداد تارهای عضلانی دخیل است. میواستاتین فاکتور رشدی تغییر شکل یافته ($TGF-\beta$) و تنظیم کننده منفی فرایند میوژنز در عضلات اسکلتی است. این پروتئین به صورت خاص در عضلات بیان می شود [۲۶]. میواستاتین با فعال سازی مسیر پیام رسانی $MSTN/SMAD$ ، تأثیر مهاری خود را در رشد عضلات اسکلتی اعمال می کند [۲۸]. حذف ژن میواستاتین از طریق تنظیم فاکتور رونویسی Pax7 موجب تکثیر و تمایز سلول های ماهوارهای می شود. این پدیده در نهایت افزایش توده عضلانی را منجر می شود [۲۹]. میواستاتین در سلول های عضلانی دارای عملکرد دوگانه ای است؛ از سویی موجب بالارفتن بیان ژن Fax-1 (مسیر مهم درون سلولی و تجزیه کننده پروتئین) و در نهایت آپوپتوز می شود و از سوی دیگر، موجب کاهش میزان mTOR (مهمترین تنظیم کننده درون سلولی تولید پروتئین) می شود [۳۰]. مطالعات نشان داده است مهمترین تأثیر میواستاتین در کاهش فعالیت، تمایز یافتگی، تکثیر و خاصیت بازسازی خودبه خودی سلول های ماهوارهای از طریق مسیرهای سیگنالی SMAD 1, 2, 3 است [۳۱]. میواستاتین همچنین مهار تکثیر و تمایز میوبلاست ها و همچنین هیپرتروفی را از مسیرهای سلولی دیگری به نام Akt/mTOR نیز تنظیم کرده و مانع سنتز پروتئین عضلانی می شود. انجام تمرینات ورزشی با اثرگذاری بر IGF-1 و فعال سازی مسیر فوق از آتروفی عضلات بیماران با کم کاری تیروئید جلوگیری می کند [۳۲].

از دیگر نتایج تحقیق حاضر می توان به افزایش معنی دار بیان ژن فول استاتین نسبت به گروه کنترل اشاره نمود. در همین راستا بهرامی و همکاران به بررسی تأثیر تمرینات TRX بر سطوح سرمی فول استاتین مردان دارای اضافه وزن پرداختند و افزایش معنی دار آن را نشان دادند [۳۳]. همچنین کریمی و همکاران تأثیر تمرینات ورزشی به همراه مکمل را مطالعه کردند و افزایش مقادیر فول استاتین را گزارش کردند [۳۴].

1. Carneiro
2. Hittel
3. Willoughby

این بیماران مطرح شود [۳۹].

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد فعالیت استقامتی با تأثیر مثبت بر بیان ژن های درگیر در ماهیچه بیماران با کم کاری تیروئید از آتروفی عضلات آنها جلوگیری می کند و روند بهبود بیماران هیپوتیروئیدی مناسب است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی پست دکتری نویسنده اول بوده است. این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد اراک با کد اخلاق IR.IAU.ARAK.REC.1403.273 به تصویب رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همه کسانی که در این طرح پژوهشی همکاری داشتند، ابراز می دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان

همه نویسندگان در ایده پردازی و انجام طرح، همچنین نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهمیم بوده اند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می پذیرند.

منابع مالی

در این پژوهش از هیچ ارگانی کمک مالی دریافت نگردید.

نتایج تحقیق الیوت^۱ و همکاران نیز نشان داد مقادیر سرمی فول استاتین افراد سالمند غیر ورزشکار پس از شش هفته تمرینات ورزشی با شدت بالا افزایش معنی داری به همراه داشت [۳۵]. همچنین تحقیق هنس و همکاران نیز نشان داد ترشح فول استاتین پلاسما در فعالیت های ورزشی مثل دوچرخه سواری، خم کردن زانو و یک ساعت شنا افزایش می یابد [۳۶]. اما در تحقیق بیگلری و همکاران گزارش شد که تمرینات ورزشی با شدت بالا افزایش معنی داری در بیان فول استاتین موش های صحرایی به همراه نداشت [۳۷]. دلیل این تناقض با پژوهش حاضر می تواند در نوع و شدت تمرین باشد. در پژوهش بیگلری و همکاران از تمرینات تناوبی با شدت بالا با حداکثر اکسیژن مصرفی ۸۵ تا ۹۰٪ استفاده شده بود در صورتی که در پژوهش حاضر حداکثر اکسیژن مصرفی بین ۴۵ تا ۵۵٪ است. نتایج تحقیقات بیان شده همسو با افزایش مقدار ژن فول استاتین در تحقیق حاضر است. به نظر می رسد فول استاتین از طریق مهار اکتیوین و کاهش سیگنالینگ میو استاتین داشته و یک هدف درمانی امیدوارکننده در تنظیم رشد عضلانی، سندرم متابولیک و حتی التهاب است. اکتیوین یک پروتئین از خانواده TGF- β که مهمترین وظایف ژن فول استاتین مهارسازی اعمال آن به ویژه میو استاتین است. میو استاتین در حضور فول استاتین توانایی متصل شدن به گیرنده خود را ندارد و با این وجود عملکرد پروتئین میو استاتین را خنثی و تحت کنترل قرار می دهد. تمرینات بدنی با اثرگذاری در مسیرهای بیان شده از آتروفی عضلانی بیماران با کم کاری تیروئید جلوگیری کرده و منجر به هیپرتروفی می شود [۳۸]. همچنین می توان اشاره نمود هیپرتروفی عضلانی هنگامی رخ می دهد که مسیرهای متابولیکی به ویژه گلیکولیز که با انتقال گلوکز به سلول شروع می شود، به خوبی فعالیت داشته باشند. افزایش فول استاتین منجر به تحریک سیگنالینگ انسولینی شده و می تواند به عنوان یک مسیر دیگر در جلوگیری از آتروفی

1. Elliott

References

1. Taylor PN, Albrecht D, Scholz A, Gutierrez-Buey G, Lazarus JH, Dayan CM, et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nature Reviews. Endocrinology*. 2018;14(5):301-316. doi:10.1038/nrendo.2018.18
2. Brenta G. Why can insulin resistance be a natural consequence of thyroid dysfunction? *Journal of Thyroid Research*. 2011;2011:152850. doi:10.4061/2011/152850
3. Biondi B, Cappola AR, Cooper DS. Subclinical Hypothyroidism: A Review. *JAMA*. 2019;322(2):153-160. doi:10.1001/jama.2019.9052
4. Rotondi M, Magri F, Chiovato L. Thyroid and obesity: Not a one-way interaction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(2):344-346. doi:10.1210/jc.2010-2515
5. Nappi A, Moriello C, Morgante M, Fusco F, Crocetto F, Miro C. Effects of thyroid hormones in skeletal muscle protein turnover. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2024;35(4-5):253-264. doi:10.1515/jbcpp-2024-0139
6. Kalantar Hormozi MR, Nabipour I, Assadi M, Asadipouya K, Zendejboudi S, Ranjbar Omrani G. Subclinical hypothyroid. *Iranian South Medical Journal*. 2011;14(1):51-60. [Persian]
7. Rooyackers OE, Nair KS. Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 1997;17:457-485. doi:10.1146/annurev.nutr.17.1.457
8. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2003;285(2):E363-371. doi:10.1152/ajpendo.00487.2002
9. Saunders MA, Good JM, Lawrence EC, Ferrell RE, Li WH, Nachman MW. Human adaptive evolution at Myostatin (GDF8), a regulator of muscle growth. *American Journal of Human Genetics*. 2006;79(6):1089-1097. doi:10.1086/509707
10. Carneiro I, Castro-Piedras I, Muñoz A, Labandeira-García JL, Devesa J, Arce VM. Hypothyroidism is associated with increased myostatin expression in rats. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2008;31(9):773-778. doi:10.1007/bf03349256
11. Lagally KM, Robertson RJ. Construct validity of the OMNI resistance exercise scale. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2006;20(2):252-256. doi:10.1519/r-17224.1
12. Willoughby DS. Effects of an alleged myostatin-binding supplement and heavy resistance training on serum myostatin, muscle strength and mass, and body composition. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2004;14(4):461-472. doi:10.1123/ijsnem.14.4.461
13. Tortoriello DV, Sidis Y, Holtzman DA, Holmes WE, Schneyer AL. Human follistatin-related protein: a structural homologue of follistatin with nuclear localization. *Endocrinology*. 2001;142(8):3426-3434. doi:10.1210/endo.142.8.8319
14. Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK, Mendell JR. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle & Nerve*. 2009;39(3):283-296. doi:10.1002/mus.21244
15. Asad M, Vakili J. Effect of resistance training on plasma myostatin level in overweight untrained men. *Applied Research of Sport Management*. 2012;1(1):75-80. [Persian]
16. Esazadeh L, Hosseini Kakhk A, Khajei R, Hejazi SM. The effect of concurrent training order (resistance-aerobic) on some factors of physical fitness, functional capacity and serum levels of myostatin and follistatin hormones in postmenopausal women (clinical trial). *Journal of Sport Biosciences*. 2020;12(2):189-206. [Persian] doi:10.22059/jsb.2020.282311.1345
17. Bagheri L, Faramarzi M, Bani talebi E, Azimiyan A. The effect of sequence order of combined training (strength and endurance) on myostatin, follistatin and follistatin/myostatin ratio in older women. *Sport Physiology*. 2015;7(26):143-164. [Persian]
18. Siqueira CC, Rossoni RR, Tiengo AN, Tufik S, Schenberg LC. Methimazole-induced hypothyroidism inhibits the panic-like behaviors produced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(5):706-716. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.10.011
19. Cooper DS. Antithyroid drugs. *The New England Journal of Medicine*. 2005;352(9):905-917. doi:10.1056/NEJMr042972
20. Malekipooya M. The response of fibroblast-derived factor and endostatin to acute rehabilitation of physical activity along with electrical stimulation in infarcted rats. *Medical Journal of Mashhad university of Medical Sciences*. 2024;67(4):1249-1261. [Persian] doi:10.22038/mjms.2024.75760.4448
21. Malekipooya M. Response of acute incremental aerobic activity along with electrical stimulation on some markers of angiogenesis in Isoproterenol induced rats. *EBNESINA*. 2024;26(1):28-37. doi:10.22034/26.1.28
22. Schefer V, Talan MI. Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Experimental Gerontology*. 1996;31(3):387-392. doi:10.1016/0531-5565(95)02032-2
23. Fathi M, Mosaferi Ziaaldini M, Khairabadi S, Hejazi K. Effect of aerobic exercise on thyroid hormones and quality of life in obese postmenopausal women. *Medical Laboratory Journal*. 2018;12(6):5-11. [Persian] doi:10.29252/mlj.12.6.5
24. Rashidlamir A, Attarzadeh Hosseini SR, Hejazi K, Motevalli Anberani SM. The effect of eight weeks resistance and aerobic training on myostatin and follistatin expression in cardiac muscle of rats. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*. 2016;8(4):164-169. doi:10.15171/jcvtr.2016.33
25. Jokar M, Amirahmadi M, Sherafati Moghadam M. The effect of endurance training on the content myostatin and smad2/3 proteins in the left ventricular tissue of the heart muscle of type 1 diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders*. 2021;20(3):191-199. [Persian]

26. Asad M, Vakeli J. The effect of concurrent (resistance and endurance) training on plasma myostatin levels in obese non-athlete men. *Journal of Sport Biosciences*. 2013;4(15):77-89. [Persian] doi:10.22059/jsb.2013.29779
27. Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2010;42(11):2023-2029. doi:10.1249/MSS.0b013e3181e0b9a8
28. Fedoruk MN, Rupert JL. Myostatin inhibition: A potential performance enhancement strategy? *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2008;18(2):123-131. doi:10.1111/j.1600-0838.2007.00759.x
29. McFarlane C, Hennebry A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M, et al. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Experimental Cell Research*. 2008;314(2):317-329. doi:10.1016/j.yexcr.2007.09.012
30. Wulschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016
31. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *American Journal of Physiology*. 1999;277(2 Pt 2):R601-606. doi:10.1152/ajpregu.1999.277.2.r601
32. Latres E, Pangilinan J, Miloscio L, Bauerlein R, Na E, Potocky TB, et al. Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice. *Skeletal Muscle*. 2015;5:34. doi:10.1186/s13395-015-0060-8
33. Bahram ME, Hemmati S, Vahedi Cole Sara N, Afroundeh R, Davarpanah S. The effect of training TRX on serum levels of myostatin and Follistatin and neuromuscular function in overweight elderly men. *Iranian Journal of Rehabilitation Research in Nursing*. 2023;9(3):88-98. [Persian] doi:10.22034/ijrn.9.3.9
34. Karimi R, Fakhripour R, Zarneshan A. Effect of resistance training with milk protein concentrate (MPC) supplementation on serum levels of follistatin and myostatin and muscle hypertrophy in beginner bodybuilders. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2022;9(1):151-163. [Persian] doi:10.22049/jahssp.2022.27812.1471
35. Elliott BT, Herbert P, Sculthorpe N, Grace FM, Stratton D, Hayes LD. Lifelong exercise, but not short-term high-intensity interval training, increases GDF11, a marker of successful aging: a preliminary investigation. *Physiological Reports*. 2017;5(13):e13343. doi:10.14814/phy2.13343
36. Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, Hojman P, Whitham M, Febbraio MA, et al. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. *Endocrinology*. 2011;152(1):164-171. doi:10.1210/en.2010-0868
37. Biglari S, Gaeini AA, Kordi MR, Ghardashi Afousi A. The effect of 8 weeks high-intensity interval training on myostatin and follistatin gene expression in gastrocnemius muscle of the rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2018;21(1):1-10. [Persian]
38. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Skouvaklidou EC, Kynigopoulos G, Saridakis ZG, Apostolou A, et al. Circulating follistatin displays a day-night rhythm and is associated with muscle mass and circulating leptin levels in healthy, young humans. *Metabolism*. 2016;65(10):1459-1465. doi:10.1016/j.metabol.2016.07.002
39. Tao R, Wang C, Stöhr O, Qiu W, Hu Y, Miao J, et al. Inactivating hepatic follistatin alleviates hyperglycemia. *Nature Medicine*. 2018;24(7):1058-1069. doi:10.1038/s41591-018-0048-0