

Original Article

The effect of the eight weeks of high intensity interval training and low intensity continuous training along with *Citrus aurantium* extract on tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in soleus muscle tissue of aged female rats

Mina Jafari¹, Sedigheh Hosseinpour Delavar^{1*}, Hassan Safikhani¹,
Masoomeh Azizi²

ABSTRACT

Background and Aims: Exercise and appropriate nutrition are two effective factors on the improvement of immune system in elderly people. This study aimed to investigate the effect of eight weeks of high-intensity interval training (HIIT) and low-intensity continuous training (LICT) along with *Citrus aurantium* (CA) extract on tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in soleus muscle tissue of aged female rats.

Materials and Methods: A total of 42 aged female rats were divided into (1) control (C), (2) LICT, (3) HIIT, (4) LICT+CA, (5) HIIT+CA, (6) CA, and (7) sham (normal-saline) groups. During eight weeks, HIIT was performed with an intensity of 85-90% of maximum speed and LICT with an intensity of 65% of maximum speed for five sessions per week, and 300 mg/kg/day of *Citrus aurantium* extract was daily intraperitoneally injected. The collected data were analyzed using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc statistical tests ($P \leq 0.05$).

Results: TNF- α in LICT ($P=0.001$), HIIT+CA ($P=0.004$) and LICT+CA ($P=0.007$) groups were significantly lower than the C group. In the LICT group, TNF- α was significantly lower than the CA ($P=0.001$), HIIT ($P=0.001$), LICT+CA ($P=0.02$), and HIIT+CA ($P=0.014$) groups. It was also lower in the LICT+CA ($P=0.007$) and HIIT+CA ($P=0.011$) groups than the HIIT group. IL-6 levels in HIIT+CA group were significantly lower than the control group ($P=0.02$).

Conclusion: It seems that the training (continuous and interval) along with CA extract has favorable effect on TNF- α compared to HIIT; however, investigating the mechanism of intensity and type of training as well as different dosage of CA on IL-6 requires further studies.

Keywords: Aged, *Citrus aurantium*, Exercise, Inflammation, Soleus Muscle



Citation: Jafari M, Hosseinpour Delavar S, Safikhani H, Azizi M. [The effect of the eight weeks of high intensity interval training and low intensity continuous training along with *Citrus aurantium* extract on tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in soleus muscle tissue of aged female rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2022; 29(3): 229-240. [Persian]

DOI <https://www.doi.org/10.34785/bums024.2023.005>

Received: July 21, 2022

Accepted: December 17, 2022

¹ Department of Exercise Physiology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

² Department of physical education and sport sciences, Islamic Azad University, Abadan Branch, Abadan, Iran

***Corresponding author:** Department of Exercise Physiology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
Tel: +989188335826 Fax: +9883372443181 E-mail: delavar2009@iauksh.ac.ir

اثر هشت هفته تمرین تناوبی شدید و تداومی کم شدت همراه با عصاره بهار نارنج بر عامل نکرودهنده تومور آلفا و اینترلوکین-۶ در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند

مینا جعفری^۱، صدیقه حسین پور دلاور^{۱*}، حسن صفی‌خانی^۲، معصومه عزیزی^۲

چکیده

زمینه و هدف: فعالیت ورزشی و تغذیه مناسب دو عامل مؤثر بر بهبود سیستم ایمنی در افراد سالمند می‌باشد. هدف مطالعه حاضر اثر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) و تداومی کم شدت (LICT) همراه با بهار نارنج (CA) بر عامل نکرودهنده تومور آلفا (TNF- α) و اینترلوکین-۶ (IL-6) در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند بود.

روش تحقیق: ۴۲ سر موش صحرایی ماده سالمند به گروه‌های (۱) کنترل، (۲) تمرینات تداومی با شدت پایین، (۳) تمرین تناوبی شدید، (۴) تمرین تداومی کم شدت+بهار نارنج، (۵) تمرین تناوبی شدید+بهار نارنج، (۶) بهار نارنج و (۷) گروه شم (نرمال-سالمین) (Sham) تقسیم شدند. در مدت هشت هفته تمرینات تناوبی شدید با شدت ۸۵-۹۰ درصد حداکثر سرعت دویدن و تمرینات تداومی کم شدت با شدت ۶۵ درصد حداکثر سرعت دویدن به میزان پنج جلسه در هفته انجام شد و عصاره بهار نارنج به میزان روزانه ۳۰۰ mg/kg/day به صورت داخل صفاقی تزریق شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک-طرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($P \leq 0.05$).

یافته‌ها: مقادیر TNF- α در گروه‌های تداومی کم شدت ($P=0/001$)، تناوبی شدید+عصاره ($P=0/004$) و تداومی کم شدت+عصاره ($P=0/007$) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود؛ در گروه تداومی کم شدت به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های عصاره ($P=0/001$)، تناوبی شدید ($P=0/001$)، تداومی کم شدت+عصاره ($P=0/002$)، تناوبی شدید+عصاره ($P=0/014$) بود؛ همچنین در گروه‌های تداومی کم شدت+عصاره ($P=0/007$) و تناوبی شدید + عصاره ($P=0/011$) کمتر از گروه تناوبی شدید بود. مقادیر IL-6 در گروه تناوبی شدید+عصاره به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($P=0/02$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین (تناوبی و تداومی) همراه با مصرف عصاره بهار نارنج نسبت به تمرین تناوبی اثرات مطلوب‌تری بر TNF- α دارد؛ اما بررسی ساز و کار شدت و نوع تمرین و همچنین دوزهای مختلف بهار نارنج بر IL-6 نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: سالمند، بهار نارنج، تمرین، التهاب، عضله نعلی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۱؛ ۲۹ (۳): ۲۲۹-۲۴۰.

دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۳۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶

^۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آبادان، دانشگاه آزاد اسلامی، آبادان، ایران

*نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

آدرس: کرمانشاه- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی

تلفن: ۰۹۱۸۸۳۳۵۸۲۶ نمابر: ۰۸۳۳۷۲۴۳۱۸۱ پست الکترونیکی: delavar2009@iauksh.ac.ir

مقدمه

سالمندی به عنوان پدیده‌ای زیستی و اجتناب ناپذیر است که به سرعت در جهان در حال افزایش است؛ به عبارتی این اتفاق با کاهش توان و عملکرد بدنی همراه است و تأثیر بسزایی در کاهش کیفیت زندگی افراد دارد (۱، ۲). کاهش توده عضلانی متعاقب سالمندی به عنوان مهم‌ترین عارضه این دوره سنی شناخته می‌شود که بخش زیادی از هزینه‌های درمانی و بهداشتی را بر دوش جوامع تحمیل کرده است (۳). افزایش استرس اکسیداتیو، کاهش عملکرد هورمون‌های آنابولیکی، ضعف عصبی-عضلانی و افزایش عوامل التهابی از عوامل سارکوپنیا گزارش شده‌اند (۳، ۴). به عبارتی واکنش‌های التهابی به عنوان پاسخی در برابر آسیب‌ها هستند و طیف متنوعی از سیتوکین‌های پیش التهابی و التهابی را تنظیم می‌کنند؛ اما مطالعات نشان داده‌اند که متعاقب سالمندی افزایش رادیکال‌های آزاد منجر به ترشح سیتوکین‌های التهابی مانند عامل نکروزدهنده تومور آلفا (TNF-α)، افزایش اینترلوکین-۶ (IL-6)، افزایش اینترلوکین-۱ بتا (IL-1β)، پروتئین واکنش گر- C (CRP)^۱ در بافت عضله اسکلتی می‌شوند که این امر به از دست دادن توده عضلانی سرعت می‌بخشد (۴). از سویی امروزه برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سالمندی روش‌های غیر تهاجمی توصیه می‌شود. در حقیقت فعالیت‌های ورزشی منظم استقامتی، مقاومتی و تمرینات ترکیبی موجب افزایش قدرت، استقامت و توان متابولیکی عضله اسکلتی می‌شود (۵، ۶، ۷). فعالیت‌های ورزشی منظم و طولانی مدت با افزایش هورمون‌های تولید شده از راه ترکیب شیمیایی، افزایش هورمون‌های رشد، کاهش رادیکال‌های آزاد منجر به کاهش عوامل التهابی، بهبود میوکین‌ها و آدیپوکین‌ها می‌شود. آدیپونکتین خود یک آدیپوکین است و در نهایت بهبود عملکرد بیولوژی عضلانی می‌شوند (۸، ۷). اگرچه نقش مطلوب تمرینات ورزشی بر بهبود عملکرد عضلانی شناخته شده است، با این حال تغییرات التهابی و استرس اکسیداتیو درون عضلانی متعاقب تمرینات ورزشی وابسته به نوع، شدت و طول دوره تمرین است (۹). به گونه‌ای که یک جلسه تمرین حاد ورزشی با

¹ C-reactive protein

افزایش ایمونوگلوبولین A، موجب افزایش IL-6، IL-8 و TNF-α در پلاسما و عضله اسکلتی گردید؛ همچنین تمرینات طولانی مدت از نوع استقامتی و ترکیبی موجب افزایش IL-10، کاهش IL-6، TNF-α در سالمندان گردید؛ علاوه بر این کاهش معنی‌داری در مقادیر IL-1β، IL-2، IL-6 و IL-8 و TNF-α نداشت (۹). همچنین یعقوبیان و همکاران به مقایسه تأثیر تمرینات مقاومتی با شدت‌های پایین، متوسط و بالا بر عوامل التهابی زنان ۵۳ تا ۵۸ ساله پرداختند و نتایج این تحقیق نشان داد که سطوح TNF-α تنها در گروه تمرینات مقاومتی با شدت بالا کاهش یافت، همچنین مقادیر IL-6 در گروه تمرین مقاومتی با شدت بالا به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های با شدت پایین، متوسط و گروه کنترل بود (۱۰). با توجه به نتایج ضد و نقیض در ارتباط با تأثیر تمرینات ورزشی بر رادیکال‌های آزاد و عوامل التهابی به نظر می‌رسد شناختن نوع تمرینات ورزشی مطلوب و با کارایی بیشتر مورد توجه محققین حوزه علوم ورزشی است. از سویی با نتایج ضد و نقیض در ارتباط با تأثیر تمرینات ورزشی بر عوامل التهابی و رادیکال‌های آزاد، محققین حوزه علوم ورزشی استفاده از گیاهان دارویی را در کنار فعالیت‌های ورزشی برای اثر بخشی بیشتر توصیه می‌کنند (۱۱). بهارنارنج و قسمت‌های مختلف این گیاه دارویی به دلیل دارا بودن مقادیر فراوانی سینفرین، ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدها دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی فراوان هستند که از دیر باز در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۱۲). به گونه‌ای که در مطالعات پیشین اثرات کاهنده IL-6، TNF-α، بهبود سیکلوکسیژناز-۲ (COX-2)، هم اکسیژناز-۱ (HO-1) و بهبود دهنده این گیاه دارویی در آنزیم‌های کبدی متعاقب آسیب بافت کبد گزارش شد (۱۲). همچنین هسپرتین و هسپریدین مشتق شده از برگ نارنج موجب مهار COX-2، نیتریک اکساید سنتاز التهابی^۴ (iNOS)، IL-1β و IL-6 و همچنین بهبود آنزیم مبدل آنژیوتانسین-۲ (ACE 2)^۵ در مطالعه درون تنی و برون تنی گردید و در نهایت محققین استفاده از این گیاه دارویی را در پیشگیری و درمان بیماری کووید-۱۹ توصیه نمودند (۶). با توجه به بررسی اثر

² Cyclooxygenase-2³ Heme oxygenase-1⁴ Inducible nitric oxide synthase⁵ Angiotensin-converting enzyme 2

هدف بررسی اثر همزمان تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی کم شدت همراه با عصاره بهار نارنج بر $TNF-\alpha$ و IL-6 در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند بود.

روش تحقیق نگهداری حیوانات

در این مطالعه تجربی از بین تمام موش‌های صحرایی ماده سالمند در محدوده سنی ۱۴-۱۸ ماهه و وزن تقریبی ۲۷۰ الی ۳۲۰ گرم موجود در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مروجشت تعداد ۴۲ سر به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند. این نکته قابل ذکر است که موش‌های صحرایی در این تحقیق در شرایط استاندارد از نظر دما، نور و رطوبت نگهداری می‌شدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد بود همچنین چرخه روشنایی نیز هر ۱۲ ساعت یک‌بار به‌طور دقیق توسط تنظیم‌کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت می‌شد. موش‌های صحرایی در این تحقیق در قفس‌های پلی‌کربنات با قابلیت اتوکلاو نگهداری می‌شدند علاوه بر این در دوره این مطالعه موش‌های صحرایی به آب و غذای استاندارد دسترسی آزادانه داشتند. تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه بر اساس معاهده هلسینکی و تحت نظر کمیته اخلاق پژوهش در مطالعات زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد مصوب IR.KUMS.REC.1399.412 رعایت گردید.

گروه‌بندی و روش اجرا

موش‌های صحرایی سالمند به‌طور تصادفی به گروه‌های (۱) کنترل (C)، (۲) شم/دریافت حلال عصاره بهار نارنج (Sham)، (۳) تمرین تناوبی شدید، (۴) تمرین تداومی کم شدت، (۵) بهار نارنج، (۶) تمرین تناوبی شدید + بهار نارنج و (۷) تمرین تداومی کم شدت + بهار نارنج قسیم شدند. این نکته قابل ذکر است که برای کنترل اثر حلال عصاره بهار نارنج و اثر تزریق، گروه Sham در طی دوره مطالعه حلال عصاره بهار نارنج را به صورت تزریق صفاقی دریافت

همزمان این گیاه دارویی در کنار فعالیت‌های ورزشی محققین دیگری نیز به بررسی اثر همزمان آن‌ها پرداخته‌اند، به عنوان مثال تمرینات تناوبی شدید (HIIT) و تداومی کم شدت (LICT) همراه با بهارنارنج (CA) موجب بهبود آستانه تحمل درد در موش‌های صحرایی سالمند گردید؛ اما اثر همزمان آن‌ها بر تعادل حرکتی معنی دار نبود (۱۳). در مطالعه شیخ‌الاسلامی و همکاران نتایج نشان داد تعامل تمرین و مصرف بهارنارنج موجب بهبود بیوژنز میتوکندری در کبد موش‌های صحرایی سالمند می‌گردد (۱۴). در مطالعه پیشین ما نیز ترکیب هر دو نوع تناوبی و تداومی تمرین و منجر به بهبود نشانگرهای اتوفازی و بازسازی عضلانی در عضله اسکلتی گردید (۱۵). با توجه به بررسی‌های انجام شده محدودیت مطالعات دیگر و همچنین مطالعه قبلی ما عدم بررسی ترکیب این مداخلات (تمرین تناوبی شدید، تمرین تداومی کم شدت و بهار نارنج) بر عوامل التهابی در بافت عضله اسکلتی بود. لذا به نظر می‌رسد انجام تحقیق حاضر می‌تواند خلا اطلاعات پیشین بر مسیرهای التهابی و ساز و کار عضلانی در شرایط سالمندی را پر کند. اگرچه یافته‌های مطالعات اپیدمیولوژیک در رابطه با شیوع سارکوپنی و مکانیسم‌های التهابی درگیر در آن در زنان و مردان متناقض می‌باشد؛ با این وجود در چندین مطالعه اشاره شده است که میزان کاهش مطلق توده عضلانی در مردان بالاتر از زنان است. در بررسی مکانیسم‌های وابسته به جنسیت سارکوپنی گزارش شده است که سارکوپنی در زنان نسبت به مردان با خطر مرگ و میر بالاتری همراه می‌باشد. در واقع، یافته‌های مطالعه قلب فرامینگهام نشان داد که کاهش طولانی مدت در میزان توده بدون چربی ناشی از حذف محرک‌های آنابولیک در مردان می‌باشد با این وجود در زنان منعکس‌کننده افزایش محرک‌های کاتابولیک است که به وسیله IL-6 نشان داده می‌شود (۱۶). از این رو در مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات نوع ورزش در جلوگیری از اختلالات ناشی از سالمندی از موش‌های صحرایی ماده سالمند استفاده شده است. این نکته قابل ذکر است که با توجه به اینکه کنترل رژیم غذایی، استفاده از گیاهان دارویی در دسترس در دوره مصرف مکمل از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. در مطالعه حاضر از نمونه‌های حیوانی استفاده شده است. لذا مطالعه حاضر با

تمرین تمرین تناوبی شدید و تداومی کم شدت

برای اجرای تمرینات HIIT موش‌های صحرایی در هفته اول در ۷ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت بالا با شدتی معادل ۸۵ تا ۹۰ درصد حداکثر سرعت دویدن (سرعت ۳۱ متر در دقیقه) و ۶ تناوب با شدت پایین با شدت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد سرعت بیشینه و سرعت ۱۵ متر بر دقیقه دویدند. در ادامه سرعت تمرینات به منظور افزایش اضافه بار تمرینی به ازای هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت تمرینات افزوده شد؛ همچنین تعداد تناوب‌ها از ۷ تناوب با شدت بالا (سرعت ۵۵ متر بر دقیقه) در هفته اول به ۱۰ تناوب با شدت بالا و ۹ تناوب با شدت پایین (۲۵ متر بر دقیقه) در هفته هشتم رسید. همچنین به منظور تمرین تداومی کم شدت موش‌های صحرایی در هفته اول با شدت ۶۵ درصد حداکثر سرعت دویدن (معادل ۲۰ متر در دقیقه) و مدت زمان ۱۵ دقیقه بر روی نوارگردان دویدند و در ادامه از هفته دوم تا هشتم سرعت به طور تدریجی به ۲۵ متر در دقیقه رسید و زمان تمرینات نیز در هفته هشتم به ۳۱ دقیقه رسید. این نکته قابل ذکر است که در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرین مدت زمان سه دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه برای گرم کردن و سرد کردن در نظر گرفته شد (۲۱/جدول ۱). این نکته قابل ذکر است که در تحقیق حاضر از نوارگردان ۶ کاناله ساخت شرکت دانش سالار ایرانیان استفاده شد. در انتهای این نوارگردان جهت تحریک حرکت موش‌های صحرایی به طرف جلو شوک الکتریکی تعبیه شده است؛ به‌طوری که در صورت عدم حرکت رو به جلو موش‌های صحرایی به آن‌ها شوک الکتریکی وارد می‌شود و این شوک منجر به دویدن موش‌های صحرایی با دور موتور تعیین شده می‌گردد.

تهیه عصاره بهار نارنج

برای تهیه عصاره بهار نارنج مقدار ۵۰ گرم از پودر بهار نارنج تهیه شده از مرکز جهاد کشاورزی شهرستان مرودشت به بالنی که حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود اضافه گردید، این نکته قابل ذکر است که بالن آزمایشگاهی متصل به دستگاه Cloninger بود و عمل استخراج عصاره با استفاده از آن به مدت چهار ساعت طول کشید. در انتها عصاره جمع‌آوری شده با استفاده از سولفات سدیم که

می‌نمودند. تمرینات ورزشی در این مطالعه به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته انجام می‌گردید. همچنین مصرف عصاره بهار نارنج در طول دوره با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز بود که به صورت داخل صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق می‌گردید (۱۸، ۱۷). با توجه به نقش سیکل استروس موش‌های صحرایی ماده و اختلالات احتمالی، محققین در این تحقیق موش‌های صحرایی را هم سیکل نمودند. برای این منظور ۵۵۰ میکروگرم استرادیول والرات و ۳ میلی‌گرم پروژسترون به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن حیوانات در روغن کنجد حل شد و سپس به عضله ران موش‌های صحرایی تزریق گردید؛ پس از ۳۶ ساعت مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک توسط سمپلر به آرامی به واژن موش‌های صحرایی تزریق گردید و پس از آن دو قطره از مایع فوق برداشته شد و برای اطمینان از هم سیکل شدن اسمیر واژینال تهیه گردید؛ در ادامه نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۵۰ برابر بررسی شدند. به عبارتی موش‌های صحرایی که در دوره یکساناستروس که سلول‌ها شاخی شکل و فاقد کوکوسیت هستند به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند (۱۹).

روش ارزیابی توان هوازی برای طراحی تمرینات

در این مطالعه برای طراحی تمرینات بر اساس حداکثر سرعت دویدن از آزمون ارزیابی توان هوازی که ارتباط بسیار نزدیکی با حداکثر سرعت دویدن دارد استفاده شد. بدین منظور ابتدا موش‌های صحرایی در یک جلسه تمرین به مدت پنج دقیقه با سرعت ۶ متر در دقیقه گرم کردند. سپس به منظور رسیدن به سرعت بیشینه به ازای هر سه دقیقه سرعت نوارگردان سه متر بر دقیقه اضافه می‌شد تا موش‌های صحرایی دیگر قادر به دویدن نباشند. در تحقیقات پیشین ملاک رسیدن به حداکثر اکسیژن مصرفی واماندگی در نظر گرفته شد؛ لذا واماندگی در این تحقیق به حالتی اطلاق گردید که موش‌های صحرایی در فاصله کمتر از یک دقیقه سه بار متوالی به انتهای نوارگردان برخورد کنند (۲۰).

فاقد آب بود، آب‌گیری شد و عصاره تهیه شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- باقی ماند. ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از عصاره تهیه شده روزانه با نرمال سالین ترکیب می شد و به صورت صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق می شد (۱۸).

جدول ۱- پروتکل تمرینات تناوبی شدید و تداومی کم شدت

نوع تمرین	گرم کردن	تمرین اصلی	مرحله	سرد کردن
تمرین تناوبی شدید	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه	۷ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت بالا با شدتی معادل ۸۵ تا ۹۰ درصد حداکثر سرعت دویدن (سرعت ۳۱ متر در دقیقه) و ۶ تناوب با شدت پایین با شدت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد سرعت بیشینه و سرعت ۱۵ متر بر دقیقه	هفته اول	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه
			هفته دوم تا هشتم	
			افزایش سرعت ۲ متر بر دقیقه به صورت هفتگی و همچنین افزایش تعداد تناوب‌ها از ۷ تناوب با شدت بالا (سرعت ۵۵ متر بر دقیقه) در هفته اول به ۱۰ تناوب با شدت بالا و ۹ تناوب با شدت پایین (۲۵ متر بر دقیقه) در هفته هشتم	
تمرین تداومی کم شدت	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه	دویدن با شدت ۶۵ درصد حداکثر سرعت دویدن (معادل ۲۰ متر در دقیقه) و مدت زمان ۱۵ دقیقه	هفته اول	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه
			هفته دوم تا هشتم	
			افزایش تدریجی سرعت از هفته دوم تا هشتم به ۲۵ متر در دقیقه و رسیدن زمان تمرینات به ۳۱ دقیقه در هفته هشتم	

روش نمونه‌برداری

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ ساعت ناشتایی (به منظور پیشگیری از اثر حاد رژیم غذایی در متغیرهای تحقیق)، موش‌های صحرایی با تزریق درون صفاقی ترکیب کتامین (۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلوزین (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند؛ برای اطمینان از بی‌هوشی و عدم حس درد آزمون فشردن پا و واکنش به لمس شکم انجام شد. پس از اطمینان از بی‌هوشی کامل، شکافی در قسمت اندام تحتانی سمت راست موش صحرایی در کنار عضلات ساق پا بوجود آمد، پس از رویت عضله دو قلو و کنار زدن آن، بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی به دقت جدا شد و بلافاصله پس از توزین و شست و شو درون میکروتیوپ ویژه نگهداری بافت قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه در تانک ازت غوطه‌ور شد. همچنین از آن پس بافت عضله نعلی در دمای ۷۰- نگهداری شد تا در اولین فرصت برای اندازه‌گیری متغیرها به آزمایشگاه منتقل شود.

روش اندازه‌گیری TNF- α و IL-6 در عضله نعلی

متغیرهای این تحقیق با استفاده از روش qReal TimePCR اندازه‌گیری شدند؛ بدین منظور ابتدا از بافت عضله نعلی انکوبه شده استخراج RNA بر اساس روش کیت سپانژ، ایران، انجام گرفت. برای اطمینان از درجه خلوص RNA از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد و نمونه‌ها با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر خالص‌سازی شدند. پس از اطمینان از خلوص حداکثری RNA، نمونه‌های مطالعه برای سنتز DNA با استفاده از کیت فرمنتاز (K1621) مورد استفاده قرار گرفتند. سپس cDNA سنتز شده با پرایمرهای طراحی شده از سایت PUBMED ترکیب شدند و در دستگاه q-RT PCR جهت انجام واکنش رونویسی معکوس قرار گرفتند. این نکته قابل ذکر است که برای اطمینان از کارایی پرایمرهای تحقیق حاضر (جدول ۲) از نرم‌افزار آنالیز موجود در سایت NCBI استفاده شد و از کارایی آن‌ها اطمینان حاصل شد. در ادامه به نمونه‌ها همراه با ژن کنترل داخلی بتا-۲-میوگلوبولین اجازه داده شد تا در دستگاه به سیکل آستانه برسند. در انتها برای کمی‌سازی داده‌ها از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد.

جدول ۲- توالی پرایمرهای تحقیق حاضر

نام ژن	توالی پرایمرها	اندازه محصول (bp)
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3'	244
	Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	
TNF- α	Forward: 5'- ATGGGCTCCCTCTCATCAGT-3'	106
	Reverse: 5'- GCTTGGTGGTTTGCTACGACG -3'	
IL-6	Forward: 5'- TCCGGAGAGGAGACTTCACA-3'	133
	Reverse: 5'- GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT-3'	

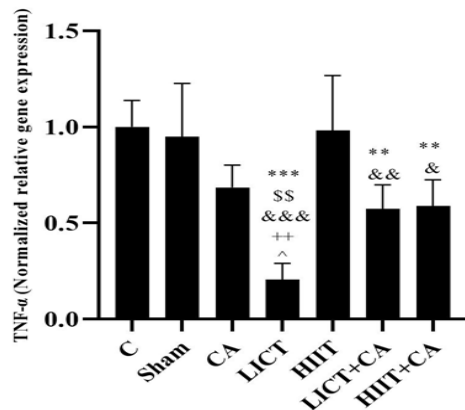
روش‌های آماری

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌های مطالعه از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات بین گروهی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد؛ سپس برای تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی در نرم‌افزار Graph Pad Prism 8.3.0 در سطح معنی‌داری در تمامی اندازه‌گیری‌ها کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.

یافته‌ها

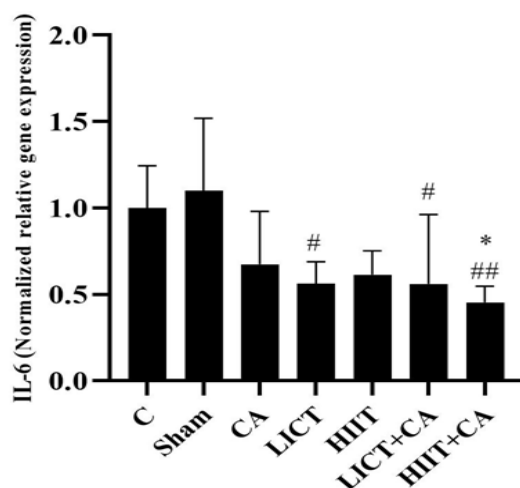
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد تفاوت معنی‌داری در مقادیر بیان ژنی TNF- α ($P=0/001$) و IL-6 ($P=0/001$) در عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند وجود دارد.

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد تفاوت معنی‌داری مقادیر TNF- α در گروه‌های شم ($P=0/99$)، بهار نارنج ($P=0/06$) و تناوبی شدید ($P=0/99$) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد؛ ولی در گروه‌های تمرین تناوبی کم شدت ($P=0/001$)، تناوبی شدید + بهار نارنج ($P=0/004$) و تناوبی کم شدت + بهار نارنج ($P=0/007$) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. همچنین در تناوبی کم شدت به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های بهار نارنج ($P=0/0012$) و تناوبی شدید ($P=0/001$)، تناوبی کم شدت + بهار نارنج ($P=0/02$)، تناوبی شدید + بهار نارنج ($P=0/014$) بود. همچنین در گروه‌های تناوبی کم شدت + بهار نارنج ($P=0/007$) و تناوبی شدید + بهار نارنج ($P=0/011$) کمتر از گروه تناوبی شدید بود (نمودار ۱).

نمودار ۱- مقادیر بیان ژنی TNF- α در عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند

گروه کنترل: C؛ گروه شم Sham؛ بهار نارنج: CA؛ تمرین تناوبی کم شدت: LICT؛ تمرین تناوبی شدید: HIIT؛ تمرین تناوبی کم شدت+بهار نارنج: LICT+CA و تمرین تناوبی شدید + بهار نارنج: HIIT+CA
 ** ($P=0/01$) و *** ($P=0/001$) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه C
 ** ($P=0/01$) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه CA
 $^{++}$ ($P=0/01$) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه LICT+CA
 $^{&}$ ($P=0/05$)، $^{&&}$ ($P=0/01$) و $^{&&&}$ ($P=0/001$) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه HIIT
 $^{\wedge}$ ($P=0/05$) کاهش معنی‌دار در گروه LICT نسبت به گروه HIIT+CA

شود (۲۲). اما مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت‌های ورزشی طیف متنوعی از اثرات را بر سلول‌های کشنده طبیعی (NK)، نوتروفیل‌ها و لکوسیت‌های بدن می‌گذارند (۲۳). به نظر می‌رسد انجام فعالیت‌های بدنی منظم و طولانی مدت منجر به سازگاری‌های ایمنی شده و با اثر بر ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و لکوسیت‌ها منجر به افزایش بیان سیتوکاین‌های ضد التهابی می‌گردند. اعتقاد محققین بر این است که رهائش IL-6 متعاقب فعالیت ورزشی به عنوان تیغ دولبه‌ای در نظر گرفته می‌شود که اگرچه به عنوان یک سیتوکاین التهابی نیز شناخته می‌شود؛ اما برای فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی مرتبط با گلیکوژن در کبد مثبت عمل می‌کند؛ از این رو به نظر می‌رسد تغییرات این سیتوکاین به شرایط زمینه‌ای التهاب مانند سالمندی، بیماری و دیگر عوامل در بافت عضلانی وابسته باشد (۲۲). (۲۱). همسو با یافته‌های مطالعه حاضر اثرات بهبود دهنده سیستم ایمنی هشت هفته تمرینات استقامتی در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی مبتلا به آلزایمر گزارش شد (۲۴)، هشت هفته تمرین استقامتی با ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی موجب بهبود TNF- α در عضله کشنده دراز انگشتان موش‌های سالم گردید؛ اما اثر معنی‌داری بر مقادیر IL-6 نداشت (۲۵)؛ همچنین در مطالعه‌ای محققین اشاره کردند که تمرینات ورزشی منجر به افزایش مقادیر بافتی و سرمی IL-6 گردید و این عامل موجب افزایش لیپولیز، سرکوب تولید TNF- α و افزایش تولید کورتیزول می‌گردد (۲۶). این نکته قابل ذکر است که سازوکار IL-6 در خون و عضله متفاوت می‌باشد به طوری که در عضله دارای نقش متابولیسم و همچنین میانجی اصلی اثر مثبت ورزش در حساسیت به انسولین می‌باشد؛ اما نا همسو با مطالعه حاضر محققین نشان دادند که فعالیت‌های ورزشی می‌توانند با فعال کردن مونوسیت‌های ترشح‌کننده سیتوکاین‌های ضدالتهابی همزمان موجب مهار مونوسیت‌های ترشح‌کننده عوامل التهابی گردد که فرآورده این عوامل التهابی می‌تواند TNF- α و IL-1b باشد (۲۲). از این رو به نظر می‌رسد عدم تغییر TNF- α در تمرین تناوبی شدید به شدت تمرین وابسته است؛ در حالی که کاهش TNF- α در تمرینات تداومی کم شدت در این مطالعه نیز مشهود است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد مصرف عصاره بهار نارنج



نمودار ۲- مقادیر بیان ژنی IL-6 در عضله نعلی موش‌های

صحرایی ماده سالمند

گروه کنترل: C؛ گروه شم Sham؛ بهار نارنج: CA؛ تمرین تداومی کم شدت:

LICT؛ تمرین تناوبی شدید: HIIT؛ تمرین تداومی کم شدت+بهار نارنج:

LICT+CA و تمرین تناوبی شدید + بهار نارنج: HIIT+CA

* (P=0/05) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه C

(P=0/05) و ## (P=0/01) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه Sham

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمرین تداومی کم شدت و تناوبی شدید همراه با بهار نارنج و همچنین تداومی کم شدت به تنهایی منجر به بهبود TNF- α در بافت عضله نعلی گردید با این وجود اثر تمرین تداومی کم شدت به تنهایی بر بهبود TNF- α بالاتر از تداومی کم شدت + بهار نارنج و تناوبی شدید + بهار نارنج بود. همچنین تمرین تناوبی شدید همراه با بهار نارنج منجر به بهبود IL-6 در بافت عضله نعلی گردید. در حقیقت در مطالعه حاضر تمرین تداومی کم شدت موجب کاهش مقادیر بیان ژنی TNF- α در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی سالمند ماده گردید؛ با این حال تمرین تناوبی شدید اثر معنی‌داری بر آن نداشت؛ همچنین تمرین تناوبی شدید و تداومی کم شدت اثر معنی‌داری بر کاهش IL-6 در بافت عضله نعلی نداشت. با این حال کاهش IL-6 در گروه تمرین تداومی کم شدت نسبت به گروه شم معنی‌دار بود. سالمندی با تغییراتی در عواملی چون ژنتیک، متابولیسم و از دست دادن عضله اسکلتی موجب بروز اختلالات و کاهش توان حرکتی در افراد می

اثر معنی‌داری بر کاهش $TNF-\alpha$ و IL-6 در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند نداشت. بر اساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد بهار نارنج و پلی‌ساکاریدهای موجود در آن از مسیر تعدیل سیستم ایمنی، فعال‌سازی کینازهای برون سلولی^۱ (ERK)، کیناز - N ترمینال- c-jun^۲ (JNK)، P38 و P65 موجب فعالیت‌های بیولوژیکی مطلوبی در سلول می‌شوند؛ علاوه بر این بهار نارنج با تعدیل iNOS افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی منجر به کاهش عوامل التهابی مانند $TNF-\alpha$ ، IL-1 β و IL-6 می‌شود (۲۷)؛ همچنین بهار نارنج و ترکیبات آن با فعال‌سازی مسیرهای رونویسی متابولیکی، منجر به مهار عامل رونویسی هسته ای کاپا B^۳ (NF- κ B) که عامل رونویسی از پروتئین‌های التهابی است می‌شود؛ علاوه بر این مهار بیان ژنی COX-2 و تعدیل I κ B α متعاقب مصرف بهار نارنج از دیگر مکانیسم‌های این گیاه دارویی برای کاهش عوامل التهابی است (۲۸). اگرچه محدودیت اطلاعاتی در زمینه اثرات بهار نارنج بر عوامل التهابی در بافت عضله وجود دارد با این حال مطالعه‌ای نشان داد که دوز مصرفی این گیاه دارویی و طول دوره مصرف عاملی مهم در اثر بخشی آن است. به‌طوری که در مقایسه دوزهای ۳۰۰ mg/kg، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نیز عوارض جانبی مشاهده نشد (۲۹). همچنین در یک مطالعه محققین نشان دادند که بهار نارنج اگرچه موجب افزایش بیان کبدی پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP^۴ (AMPK) گردید، با این حال اثر معنی‌داری بر مقادیر فسفاتیدیل اینوزیتول-۳-کیناز^۵ (PI3K) در موش‌های صحرایی سالمند نداشت (۱۴). همسو با مطالعه حاضر در مطالعه مقصود و همکاران نیز بیان شد که این گیاه دارویی اثرات ضد التهابی و ضد آپوپتوزی در سلول دارد (۲۷). با این حال با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی این گیاه و ضد التهابی آن که در مطالعات پیشین گزارش شده بود، با این حال مطالعه‌ای یافت نشد که به بررسی اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارویی در

عضله اسکلتی پرداخته باشد. از این رو مقایسه مطالعه حاضر با مطالعات دیگر دارای محدودیت می‌باشد؛ علاوه بر این به نظر می‌رسد هر چند در مطالعه ما متعاقب مصرف بهار نارنج عوامل التهابی مانند $TNF-\alpha$ و IL-6 کاهش معنی‌داری نداشتند؛ ولی نکته قابل توجه این است که با توجه به افزایش عوامل التهابی متعاقب افزایش سن را تعدیل کرده است یا تا حدی اندک کاهش داده است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد تدامی کم شدت + بهار نارنج و تناوبی شدید + بهار نارنج موجب کاهش بیان $TNF-\alpha$ گردید؛ همچنین مقادیر IL-6 متعاقب تداومی کم شدت + بهار نارنج کاهش یافت. کاهش مقادیر IL-6 در گروه تداومی کم شدت نسبت به گروه شم نیز مشاهده شد. از سویی نتایج حاکی از این بود که تمرین تداومی کم شدت در کاهش $TNF-\alpha$ اثری مطلوب‌تر نسبت به تدامی کم شدت + بهار نارنج و تناوبی شدید + بهار نارنج داشت. در زمینه اثرات همزمان تمرین ورزشی و بهار نارنج مطالعات مختلفی گزارش شده است، به‌عنوان مثال در مطالعه قبلی ما تمرین تمرین تناوبی شدید و تداومی کم شدت همراه با بهار نارنج موجب افزایش اتوافازی و افزایش مقادیر بیان ژنی MyoD در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالمند ماده شد (۱۵). همچنین در یک مطالعه بالینی محققین نشان دادند که مصرف بهار نارنج قبل از فعالیت ورزشی اثرات مطلوبی بر عملکرد قلبی مردان سالم دارد (۳۰). همچنین در مطالعه‌ای نیز نتایج نشان داد تمرین استقامتی و مصرف بهار نارنج موجب بهبود بیان ژنی AMPK (۱۴) در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند گردید. با توجه به بررسی مطالعات پیشین به نظر می‌رسد تمرین در بافت عضله اسکلتی ساز و کارهایی متفاوت از سایر بافت‌ها دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر نتیجه‌گیری می‌شود ترکیب تمرین تناوبی شدید و بهار نارنج می‌تواند منجر به بهبود $TNF-\alpha$ و IL-6 در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند شود؛ همچنین تمرین تداومی کم شدت به تنهایی و در ترکیب با بهار نارنج منجر به بهبود $TNF-\alpha$ در بافت عضله نعلی موش‌های

^۱ Extracellular signal-regulated kinase (ERK)

^۲ c-Jun N-terminal kinases (JNK)

^۳ Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B (NF- κ B)

^۴ AMP-activated protein kinase (AMPK)

^۵ Phosphoinositide 3-kinases (PI3K)

متوسط همراه با مصرف عصاره بهار نارنج بر عوامل التهابی، ساختار و عملکرد عضلانی موش های صحرایی ماده سالمند"، در مقطع دکتری تخصصی در سال ۱۴۰۱ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه می باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد و کارشناسان آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی حیوانی این واحد دانشگاهی اجرا شده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

صحرایی ماده سالمند می شود. با توجه به تأثیر شدت و نوع تمرین بر سیستم ایمنی پیشنهاد می شود. در مطالعات آتی به بررسی اثر فعالیت های ورزشی با شدت های مختلف به همراه دوزهای مصرفی بالاتر بهار نارنج بر سیتوکین های ضد التهابی و همچنین بررسی های پاتولوژی پرداخته شود. علاوه بر این با توجه به تأثیر مکانیسم های سلولی و مولکولی بر حجم و عملکرد عضلانی، عدم ارزیابی این دو عامل از محدودیت های مطالعه حاضر می باشند، لذا در مطالعات آتی پیشنهاد می گردد محققین NF-kB و PGC1a را ارزیابی کنند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه با کد ۱۹۲۲۱۴۰۴۹۸۱۰۰۶ تحت عنوان "تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید و تداومی با شدت

منابع:

- 1- Hosseini SA, Salehi O, Keikhosravi F, Hassanpour G, Ardakani HD, Farkhaie F, et al. Mental health benefits of exercise and genistein in elderly rats. *Exp Aging Res*. 2022; 48(1): 42–57. DOI: [10.1080/0361073X.2021.1918473](https://doi.org/10.1080/0361073X.2021.1918473)
- 2- Asoudeh F, Dashti F, Raeesi S, Heshmat R, Bidkhori M, Jalilian Z, et al. Inflammatory cytokines and sarcopenia in Iranian adults-results from SARIR study. *Sci Rep*. 2022; 12(1): 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09139-3>. DOI: [10.1038/s41598-022-09139-3](https://doi.org/10.1038/s41598-022-09139-3)
- 3- Hosseini SA, Zar A, Darakhshandeh M, Salehi OR, Amiri R. The Effect of Volume and Intensity Changes of Exercises on Lipid Profile of Elderly Men. *J Gerontol*. 2017; 1(4): 38–46. [Persian] URL: <http://joge.ir/article-1-109-en.html>
- 4- Manrique-Espinoza B, Palazuelos-González R, Pando-Robles V, Rosas-Carrasco O, Salinas-Rodríguez A. Is there an association between inflammatory markers and lower physical performance in older adults? *BMC Geriatr*. 2022; 22: 403. DOI: [10.1186/s12877-022-03091-7](https://doi.org/10.1186/s12877-022-03091-7)
- 5- Seo JH, Lee Y. Association of physical activity with sarcopenia evaluated based on muscle mass and strength in older adults: 2008–2011 and 2014– 2018 Korea National Health and Nutrition Examination Surveys. *BMC Geriatr*. 2022; 22(1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12877-022-02900-3>
- 6- Lu L, Mao L, Feng Y, Ainsworth BE, Liu Y, Chen N. Effects of different exercise training modes on muscle strength and physical performance in older people with sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr*. 2021; 21(1): 708. DOI: [10.1186/s12877-021-02642-8](https://doi.org/10.1186/s12877-021-02642-8)
- 7- Pahlavani HA. Exercise Therapy for People With Sarcopenic Obesity: Myokines and Adipokines as Effective Actors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 811751. DOI: [10.3389/fendo.2022.811751](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.811751)
- 8- Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005; 98(4): 1154–62. DOI: [10.1152/jappphysiol.00164.2004](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00164.2004)
- 9- Sellami M, Bragazzi NL, Aboghaba B, Elrayess MA. The impact of acute and chronic exercise on immunoglobulins and cytokines in elderly: insights from a critical review of the literature. *Front Immunol*. 2021; 12: 631873. DOI: [10.3389/fimmu.2021.631873](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631873)

- 10- Yaghoubian A, Peeri M, Azarbayjani MA. Different intensity circuit resistance training effect on the plasma level of the inflammatory cytokines, IL-6 and TNF- α in postmenopausal women. *J Basic Res Med Sci.* 2022; 9(1): 40–9. URL: <http://jbrms.medilam.ac.ir/article-1-569-en.html>
- 11- Hosseini SA, Hamzavi K, Safarzadeh H, Salehi O. Interactive effect of swimming training and fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract on glycemic indices and lipid profile in diabetic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2020; 1–5. DOI: [10.1080/13813455.2020.1826529](https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1826529)
- 12- Almallki WH. Citrus aurantium flowers essential oil protects liver against ischemia/reperfusion injury. *South African J Bot.* 2021; 142: 325–34. DOI: [10.1016/j.sajb.2021.06.041](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.041)
- 13- Salehi O, Farkhaie F, Jamali Fashi R, Rakhshanizadeh A. The Effect of Interval and Continued Trainings with Citrus Aurantium on Pain Threshold and Motor Balance in Elderly Rats. *Jorjani Biomed J.* 2022; 10(2): 1–9. <https://civilica.com/doc/1458668>
- 14- Shykholeslami Z, Abdi A, Hosseini SA, Barari A. Effect of Continuous Aerobic Training with Citrus Aurantium L. on Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinases Gene Expression in the Liver Tissue of the Elderly Rats. *J Ilam Univ Med Sci Vol.* 2022; 29 (6): 81-9. [Persian] DOI: [10.52547/sjimu.29.6.81](https://doi.org/10.52547/sjimu.29.6.81)
- 15- Jafari M, Hosseinpour Delavar S, Safikhani H, Azizi M. The Effect of Eight Weeks of Continuous and Interval Training with Citrus Aurantium Consumption on Autophagy Markers and MyoD Activation in the Muscle Tissue of Elderly Rats. *Elder Heal J.* 2021; 7(2): 71–8. DOI: [10.18502/ehj.v7i2.8120](https://doi.org/10.18502/ehj.v7i2.8120)
- 16- Tay L, Ding YY, Leung BP, Ismail NH, Yeo A, Yew S, et al. Sex-specific differences in risk factors for sarcopenia amongst community-dwelling older adults. *Age (Dordr).* 2015; 37(6): 121. DOI: [10.1007/s11357-015-9860-3](https://doi.org/10.1007/s11357-015-9860-3)
- 17- He W, Li Y, Liu M, Yu H, Chen Q, Chen Y, et al. Citrus aurantium L. and its flavonoids regulate TNBS-induced inflammatory bowel disease through anti-inflammation and suppressing isolated jejunum contraction. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(10): 3057. DOI: [10.3390/ijms19103057](https://doi.org/10.3390/ijms19103057)
- 18- Azadbakht M, Khoori V, Nayeb Pour SM, Pourabook M, Fazelinejad S. The role of adrenoceptors in the electrophysiological effects of hydroalcoholic extract of Citrus bigaradia in experimental model of atrial fibrillation of isolated atrioventricular node of rabbits. *J Maz Univ Med Sci.* 2009; 18(68): 1–10. [Persian] URL: <http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-525-en.html>
- 19- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian J Biol.* 2002; 62: 609–14. DOI: [10.1590/s1519-69842002000400008](https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008)
- 20- Li F-H, Sun L, Zhu M, Li T, Gao H-E, Wu D-S, et al. Beneficial alterations in body composition, physical performance, oxidative stress, inflammatory markers, and adipocytokines induced by long-term high-intensity interval training in an aged rat model. *Exp Gerontol.* 2018; 113: 150–62. DOI: [10.1016/j.exger.2018.10.006](https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.10.006)
- 21- Yazdanparast Chaharmahali B, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi Arkhazloo P. The Effect of Moderate and High Intensity Interval Trainings on Cardiac Apoptosis in the Old Female Rats. *Rep Heal Care.* 2018; 4(1): 26–35. URL: https://jrhc.marvdasht.iau.ir/article_2873.html
- 22- Bilski J, Pierzchalski P, Szczepanik M, Bonior J, Zoladz JA. Multifactorial mechanism of sarcopenia and sarcopenic obesity. Role of physical exercise, microbiota and myokines. *Cells.* 2022; 11(01): 160. URL: https://jrhc.marvdasht.iau.ir/article_2873.html
- 23- Docherty S, Harley R, McAuley JJ, Crowe LAN, Pedret C, Kirwan PD, et al. The effect of exercise on cytokines: implications for musculoskeletal health: a narrative review. *BMC Sports Sci Med Rehabil.* 2022; 14(1): 1–14. DOI: [10.1186/s13102-022-00397-2](https://doi.org/10.1186/s13102-022-00397-2)
- 24- Noura M, Arshadi S, Zafari A, Banaeyfar A. Effect of Endurance Training with Royal Jelly on CRP Gene Expression in Muscle Tissue of Rats with Alzheimer's Disease. *Middle East J Rehabil Heal Stud.* 7(1): e99754. DOI: [10.5812/mejrh.99754](https://doi.org/10.5812/mejrh.99754)
- 25- Lira FS, Koyama CH, Yamashita AS, Rosa JC, Zanchi NE, Batista Jr ML, et al. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell Biochem Funct.* 2009; 27(7): 458–61. DOI: [10.1002/cbf.1594](https://doi.org/10.1002/cbf.1594)

- 26- Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc.* 2004; 63(2): 263–7. DOI: [10.1079/PNS2004338](https://doi.org/10.1079/PNS2004338)
- 27- Maksoud S, Abdel-Massih RM, Rajha HN, Louka N, Chemat F, Barba FJ, et al. Citrus aurantium L. active constituents, biological effects and extraction methods. an updated review. *Molecules.* 2021; 26(19): 5832. DOI: [10.3390/molecules26195832](https://doi.org/10.3390/molecules26195832)
- 28- Shen C-Y, Jiang J-G, Zhu W, Ou-Yang Q. Anti-inflammatory Effect of Essential Oil from Citrus aurantium L. var. amara Engl. *J Agric Food Chem.* 2017; 65(39): 8586–94. DOI: [10.1021/acs.jafc.7b02586](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02586)
- 29- Deshmukh NS, Stohs SJ, Magar CC, Kale A, Sowmya B. Bitter orange (Citrus aurantium L.) extract subchronic 90-day safety study in rats. *Toxicol Reports.* 2017; 4: 598–613. DOI: [10.1016/j.toxrep.2017.11.002](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.11.002)
- 30- Benjamim CJR, de Sousa Júnior FW, Porto AA, Rocha ÉMB, Santana MD, Garner DM, et al. Bitter Orange (Citrus aurantium L.) Intake Before Submaximal Aerobic Exercise Is Safe for Cardiovascular and Autonomic Systems in Healthy Males: A Randomized Trial. *Front Nutr.* 2022; 9: 890388. DOI: [10.3389/fnut.2022.890388](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.890388)