Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

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 Jafari[1], Sedigheh Hosseinpour Delavar[1]*, Hassan Safikhani[1], Masoomeh Azizi[2]

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

مقاله اصیل پژوهشی

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

مینا جعفری[۱]، صدیقه حسین‌پور دلاور[۱]*، حسن صفی‌خانی[۱]، 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 نکروز دهنده 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 گروه¬های (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¬سالین) (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 به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. برای تجزیه و تحلیل داده¬ها از آزمون آنالیز واریانس یک¬طرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($P\leq ۰۵$).

یافته‌ها: مقادیر TNF-α در گروه¬های تداومی کم‌شدت (P=۰/۰۰۱)، تناوبی شدید+عصاره (P=۰/۰۰۴) و تداومی کم شدت+عصاره (P=۰/۰۰۷) به طور معنی¬داری کمتر از گروه کنترل بود؛ در گروه تداومی کم شدت به‌طور معنی¬داری کمتر از گروه¬های عصاره (P=۰/۰۰۱)، تناوبی شدید (P=۰/۰۰۱)، تداومی کم شدت+عصاره (P=۰/۰۲)، تناوبی شدید+عصاره (P=۰/۰۱۴) بود؛ همچنین در گروه¬های تداومی کم شدت+عصاره (P=۰/۰۰۷) و تناوبی شدید + عصاره (P=۰/۰۱۱) کمتر از گروه تناوبی شدید بود. مقادیر IL-6 در گروه تناوبی شدید+عصاره به طور معنی¬داری کمتر از گروه کنترل بود (P=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: به نظر می¬رسد 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 (۲، ۱). 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 (۲). افزایش استرس اکسیداتیو، کاهش عملکرد هورمون‌های آنابولیکی، ضعف عصبی- عضلانی و افزایش عوامل التهابی از عوامل سارکوپنیا گزارش شده‌اند(۳، ۲). 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-1beta)، پروتئین واکنش گر- C (CRP)[1] 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 روش-های غیر تهاجمی توصیه می‌شود. در حقیقت فعالیت‌های ورزشی منظم استقامتی، مقاومتی و تمرینات ترکیبی موجب افزایش قدرت، استقامت و توان متابولیکی عضله اسکلتی می‌شود (۶، ۵، ۱). 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 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 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 گروه های 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، ایزوفلاون ها 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[2] (COX-2)، هم اکسیژناز-۱[3] (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[4] (iNOS)، IL-1β و IL-6 و همچنین بهبود آنزیم مبدل آنژیوتانسین-۲[5] (ACE 2) در مطالعه درون‌تنی و برون‌تنی 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

[1] C-reactive protein

[2] Cyclooxygenase-2
[3] Heme oxygenase-1
[4] Inducible nitric oxide synthase
[5] Angiotensin-converting enzyme 2

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 اتوفاژی 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 می باشد؛ 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 هدف بررسی اثر همزمان تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی کم شدت همراه با عصاره بهار نارنج بر TNF-α 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 مرودشت 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 می شدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد بود همچنین چرخه روشنایی نیز هر ۱۲ساعت 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 به طور تصادفی به گروه های (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

می نمودند. 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 می گردید (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).

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 بهارنارنج مقدار ۵۰ گرم از پودر بهارنارنج 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

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

جدول ۱- پروتکل تمرینات تناوبی شدید و تداومی کم شدت

نوع تمرین	مرحله		
	گرم کردن	تمرین اصلی	سرد کردن
تمرین تناوبی شدید	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه	هفته اول 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 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	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه
تمرین تداومی کم شدت	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه	هفته اول دویدن با شدت ۶۵ درصد حداکثر سرعت دویدن (معادل ۲۰ متر در دقیقه) و مدت زمان ۱۵ 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	سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه

روش نمونه‌برداری

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ ساعت ناشتایی (به منظور پیشگیری از اثر حاد رژیم غذایی در متغیر های تحقیق)، موش‌های صحرایی با تزریق درون صفاقی ترکیب کتامین (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلوزین (۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند؛ برای اطمینان از بی هوشی و عدم حس درد آزمون فشردن پا و واکنش به لمس شکم انجام شد. پس از اطمینان از بی هوشی 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 سیناژن، 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 آنلاین 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 پرایمر ها	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'- GAATTGCCATTGCACAACTCTTT-3'	

روش‌های آماری

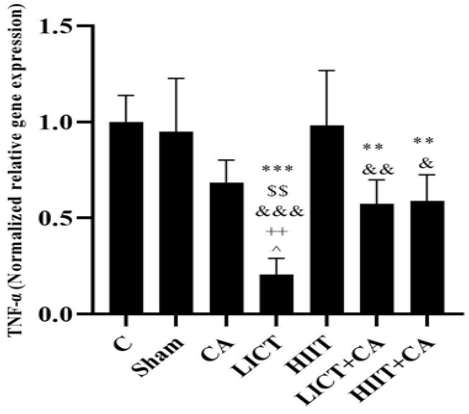
برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌های مطالعه از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات بین گروهی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد؛ سپس برای تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی در نرم‌افزار Graph Pad Prism 8.3.0 در سطح معنی‌داری در تمامی اندازه‌گیری‌ها کمتر از ۰/۰۵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

یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد تفاوت معنی‌داری در مقادیر بیان ژنی TNF-α (P=۰/۰۰۱) و IL-6 (P=۰/۰۰۱) در عضله نعلی موش‌های صحرایی ماده سالمند وجود دارد.

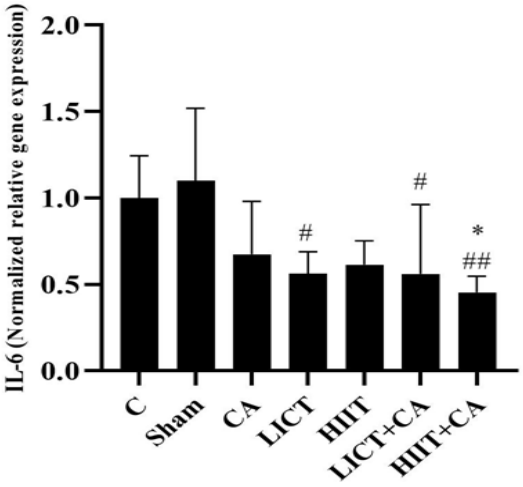
نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد تفاوت معنی‌داری مقادیر TNF-α در گروه‌های شم (P=۰/۹۹)، بهار نارنج (P=۰/۰۶) و تناوبی شدید (P=۰/۹۹) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد؛ ولی در گروه‌های تمرین تداومی کم شدت (P=۰/۰۰۱)، تناوبی شدید + بهار نارنج (P=۰/۰۰۴) و تداومی کم شدت + بهار نارنج (P=۰/۰۰۷) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. همچنین در تداومی کم شدت به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های بهار نارنج (P=۰/۰۰۱۲) و تناوبی شدید (P=۰/۰۰۱)، تداومی کم شدت + بهار نارنج (P=۰/۰۲)، تناوبی شدید + بهار نارنج (P=۰/۰۱۴) بود. همچنین در گروه‌های تداومی کم شدت + بهار نارنج (P=۰/۰۰۷) و تناوبی شدید + بهار نارنج (P=۰/۰۱۱) کمتر از گروه تناوبی شدید بود (نمودار ۱).

تفاوت معنی‌داری در مقادیر بیان ژنی IL-6 در گروه کنترل و شم مشاهده نشد (P=۰/۹۹)؛ با این حال تنها در گروه تناوبی شدید + بهار نارنج به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (P=۰/۰۲). همچنین مقادیر بیان ژنی IL-6 در گروه‌های تداومی کم شدت (P=۰/۰۲)، تداومی کم شدت + بهار نارنج (P=۰/۰۲) و تناوبی شدید + بهار نارنج (P=۰/۰۰۴) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شم بود؛ ولی تفاوت معنی‌داری در سایر گروه‌ها مشاهده نشد (نمودار ۲).



نمودار ۱- مقادیر بیان ژنی TNF-α 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=۰/۰۱) و *** (P=۰/۰۰۱) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه C
$$ (P=۰/۰۱) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه CA
++ (P=۰/۰۱) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه LICT +CA
& (P=۰/۰۵)، && (P=۰/۰۱) و &&& (P=۰/۰۰۱) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه HIIT
^ (P=۰/۰۵) کاهش معنی‌دار در گروه LICT نسبت به گروه HIIT+CA



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=۰/۰۵) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه C

(P=۰/۰۵) و ## (P=۰/۰۱) 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 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 رهایش IL-6 متعاقب فعالیت ورزشی به عنوان تیغ دولبه‌ای درنظر گرفته می‌شود که اگرچه به‌عنوان 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 به‌طوری 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 سیتوکاین های ضدالتهابی همزمان موجب مهار مونوسیت‌های ترشح کننده 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

اثر معنی‌داری بر کاهش TNF-α 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[1] (ERK)، کیناز N – ترمینال- c-jun[2] (JNK)، P38 و P65 موجب فعالیت‌های بیولوژیکی مطلوبی در سلول می‌شوند؛ علاوه بر این بهار نارنج با تعدیل iNOS و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی منجر به کاهش عوامل التهابی مانند TNF-α، IL-1β و IL-6 می شود (۲۷)؛ همچنین بهار نارنج و ترکیبات آن با فعال‌سازی مسیرهای رونویسی متابولیکی، منجر به مهار عامل رونویسی هسته ای کاپا B[3] (NF-κB) که عامل رونویسی از پروتئین‌های التهابی است می‌شود؛ علاوه بر این مهار بیان ژنی COX-2 و تعدیل IκBα 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 mg/kg ۳۰۰، 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[4] (AMPK) گردید، با این حال اثر معنی‌داری بر مقادیر فسفاتیدیل اینوزیتول-۳-کیناز[5] (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-α 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-α 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-α 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 اتوفاژی 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 می رسد تمرین در بافت عضله اسکلتی ساز و کارهایی متفاوت از سایر بافت ها دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر نتیجه‌گیری می‌شود ترکیب تمرین تناوبی شدید و بهار نارنج می‌تواند منجر به بهبود TNF-α 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-α در بافت عضله نعلی موش‌های

[1] Extracellular signal-regulated kinase (ERK)
[2] c-Jun N-terminal kinases (JNK)
[3] Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B (NF-κB)
[4] AMP-activated protein kinase (AMPK)
[5] Phosphoinositide 3-kinases (PI3K)

صحرایی ماده سالمند می‌شود. با توجه به تأثیر شدت و نوع تمرین بر سیستم ایمنی پیشنهاد می‌شود. در مطالعات آتی به بررسی اثر فعالیت‌های ورزشی با شدت‌های مختلف به همراه دوزهای مصرفی بالاتر بهار نارنج بر سیتوکین‌های ضد التهابی و همچنین بررسی‌های پاتولوژی پرداخته شود. علاوه بر این با توجه به تأثیر مکانیسم‌های سلولی و مولکولی بر حجم و عملکرد عضلانی، عدم ارزیابی این دو عامل از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشند، لذا در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد محققین NF-kB و PGC1a را ارزیابی کنند.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه با کد ۱۹۲۲۱۴۰۴۹۸۱۰۰۶ تحت عنوان"تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید و تداومی با شدت 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 ۱۴۰۱در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت و کارشناسان آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی حیوانی این واحد دانشگاهی اجرا شده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

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

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

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

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

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

8- Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. J Appl Physiol. 2005; 98(4): 1154–62. DOI: 10.1152/japplphysiol.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

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

12- Almalki 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

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

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

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

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

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 fibrilation 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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