

Research Paper  

**The effect of eight weeks of increasing resistance training and creatine-hydrochloride supplementation on myogenin and HSP70 gene expression in the soleus muscle of aged male rats**

Alireza Nikoozadeh 

Received: November 12, 2025

Revised: February 23, 2026

Accepted: February 25, 2026

**ABSTRACT**

**Objective:** It seems that with increasing age, the speed of contractile proteins and the synthesis of mitochondrial proteins of muscles decreases. The purpose of this study was to investigate the effect of eight weeks of resistance training and creatine-hydrochloride supplementation on myogenin and HSP70 gene expression in the soleus muscle of aged male rats.

**Methodology:** 32 old male were randomly divided into 4 groups: control, supplement, combined and exercise. Resistance training consisted of eight weeks of ladder training with moderate intensity (70% of MVCC) and five days a week. Rats in the supplement and combined groups received creatine-HCL at the rate of 200 mg/kg of body weight by gavage 5 days a week for 8 weeks. myogenin and HSP70 were obtained using real-time PCR method. Statistical analysis was performed with two-way and Tukey's post hoc test.

**Results:** The results showed a significant increase in the expression of HSP70 and myogenin gene in the soleus muscle in the combination group compared to the control and supplement groups ( $p=0.001$ ). No significant difference was observed between the control and supplement groups ( $p=0.158$ ).

**Conclusion:** It seems that the increase of HSP70 and the inhibition of muscle apoptosis caused by sarcopenia and the increase of mitochondrial function as well as the increased effect of myogenin on muscle hypertrophy and the creation of an anabolic environment for muscle growth in old age indicate the importance of resistance training and the consumption of protein supplements in old age.

**Keywords:** : Resistance training, creatine-hydrochloride, myogenin, HSP70.

1. Assistant Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Bonab Branch, Azad University, Bonab, Iran. (Corresponding author)

\* Corresponding author's e-mail address: [Nikoozade\\_58@iau.ac.ir](mailto:Nikoozade_58@iau.ac.ir)

**Cite this article:** Nikoozadeh, A, Cheragh Birjandi, S., Rezaeian, N., Rezaei, V (2025). The effect of eight weeks of increasing resistance training and creatine-hydrochloride supplementation on myogenin and HSP70 gene expression in the soleus muscle of aged male rats. *Journal of Metabolism and Exercise*, 15 (2), 195-211.

DOI: <https://doi.org/10.22124/jme.2026.32270.437>

## Extended Abstract

### Introduction and State of Problem

Aging is associated with a progressive decline in skeletal muscle mass and size, known as sarcopenia, which is accompanied by muscle atrophy. Myogenin is a regulatory factor that contributes to muscle development by controlling myoblast differentiation. Muscle growth and hypertrophy are influenced by several myogenic regulatory mechanisms. With advancing age and reduced physical activity, the production of reactive oxygen species (ROS) increases, and one of the main cellular responses to this stress is the induction of heat shock proteins (HSPs). Evidence suggests that resistance training and creatine supplementation can prevent muscle loss. Creatine hydrochloride (HCL), due to its higher solubility and absorption and fewer gastrointestinal side effects, is considered an effective form of creatine. Therefore, this study aimed to examine the effects of eight weeks of resistance training and creatine HCL supplementation on myogenin and HSP70 gene expression in the soleus muscle of aged male rats.

### Methodology

This study, thirty-two aged male Wistar rats (24 months old; mean body weight:  $443.2 \pm 2$  g) were used. Following a two-week familiarization period, the rats were randomly assigned to one of four groups: control, supplement (creatine HCL), combined (resistance training + creatine HCL), and training (resistance training). The resistance training protocol consisted of climbing a specially designed ladder (110 cm in height,  $80^\circ$  incline, 26 rungs spaced 2 cm apart). The training groups performed ladder climbing at 80% of their maximum voluntary carrying capacity (MVCC), with 9–10 climbs per session, five days per week, for eight consecutive weeks. Rats in the supplement and combined groups received creatine HCL at the same time as the training sessions.

Twenty-four hours after the final training session, all animals were anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine and xylazine. Surgical procedures were then performed to extract the soleus muscle tissue. The excised tissues were rinsed in physiological saline and immediately immersed in microtubes containing 1.8 mL of RNeasy lysis solution (20% concentration). The expression levels of HSP70 and myogenin mRNA were determined using TaqMan miRNA qRT-PCR reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time PCR was performed using PCR Master Mix and SYBR Green (Applied Biosystems) on a StepOne Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA), following the manufacturer's instructions.

Data normality was confirmed using the Shapiro–Wilk test. A two-way factorial ANOVA ( $2 \times 2$ ) was employed to evaluate the main and interactive effects of resistance training and creatine supplementation. When significant main or interaction effects were identified, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was applied for pairwise group comparisons. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ , and a 95% confidence interval was used for all analyses.

### Results

At the beginning of the study, there was no significant difference in the mean body weight among the experimental groups. However, during the intervention period, body weight significantly decreased in both resistance training groups (training and combined) compared with the control and supplement groups ( $p \leq 0.001$ ). Table 1 presents the general characteristics of the rats in each experimental group. The mean initial body weight of the animals ranged between  $421.25 \pm 20.3$  g and  $451.65 \pm 23.6$  g, while the final body weight varied from  $413.68 \pm 17.5$  g to  $487.13 \pm 23.5$  g. Soleus muscle weight did not show

significant differences across groups, and daily food intake remained consistent (24.22 g/day) in all groups.

Table 1. Characteristics of male rats in the research groups

	Combined	Exercise	Supplement	Control
Initial research weight	451/65±23/6	447.65±23.6	440.78±22/3	<b>421.25±20.3</b>
Final weight of the research	413.68±17.5	421.68±17.5	480.25±18/7	<b>487.13±23.5</b>
Soleus muscle weight (grams)	.30±.08	.31±.08	.38±.05	<b>.39±.06</b>
Food intake (grams/day)	24.22	24.22	24.22	<b>24.22</b>

A two-way ANOVA revealed a significant difference in HSP70 and myogenin gene expression among the four groups ( $p = 0.001$ ). Post hoc analysis indicated a significant increase in the expression of both HSP70 and myogenin genes in the combined (training + creatine HCL) and training groups compared with the supplement and control groups ( $p = 0.001$ ). The combined group demonstrated superior gene expression levels compared with all other groups. However, no significant difference was observed between the control and supplement groups ( $p = 0.105$ ).

one-way ANOVA analysis showed that The expression of HSP70 exhibited significant between-group variation ( $F = 9.39$ ,  $p = 0.001$ ). Similarly, myogenin expression showed a highly significant difference across groups ( $F = 64.39$ ,  $p = 0.001$ ). These findings suggest that resistance training, particularly when combined with creatine HCL supplementation, substantially upregulated HSP70 and myogenin gene expression in the soleus muscle of aged male rats compared with control conditions.

### Discussion and Conclusion

The results of the present study demonstrated a significant increase in HSP70 gene expression in the soleus muscle of aged male rats in both the training and combined (training + creatine HCL) groups compared with the supplement and control groups ( $p = 0.001$ ). Consistent with these findings, Roberts et al. (2024) reported that 12 weeks of moderate-intensity resistance training significantly increased HSP70 expression and reduced DNA fragmentation in the skeletal muscles of aged rats. They suggested that enhanced HSP70 expression following resistance training was accompanied by decreased levels of pro-apoptotic factors such as Bax and the Bax/Bcl-2 ratio, as well as increased anti-apoptotic Bcl-2 protein. These changes likely reduced mitochondrial apoptotic potential by decreasing the release of apoptotic factors such as cytochrome c and Apaf-1, leading to downregulation of caspase-3 (22).

Aging is associated with progressive loss of skeletal muscle mass and strength, resulting in functional decline and increased susceptibility to chronic metabolic diseases. Muscle atrophy in the lower limbs is particularly pronounced and is characterized by reduced muscle fiber size and type grouping (15). Previous research has reported a 25–40% reduction in muscle cross-sectional area across the lifespan (21). Excessive production of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial dysfunction in sarcopenia contribute to oxidative damage, inflammation, and apoptosis (23). One mechanism by which resistance training protects skeletal muscle mitochondria is through the upregulation of heat shock proteins, particularly HSP70 (26). Similar findings were reported by Bouri et al. (2024) and Zang et al. (2024), who showed that resistance training reduced caspase activation and apoptotic signaling in older adults (3, 12).

The current study also found significant increases in myogenin gene expression in both the training and combined groups, with the combined group showing superior effects. This finding aligns with Dem et al.

(2023), who observed increased myogenin expression following exercise and hormone therapy in postmenopausal women (5). Resistance training has been shown to promote myogenin-mediated hypertrophy by activating the IGF-1 signaling pathway and suppressing myostatin-related inhibition of myogenesis (7, 13). It is possible that creatine HCL supplementation enhances this response by modulating circulating myostatin and follistatin levels, thereby promoting a more anabolic environment in muscle tissue (14).

### Discussion and Conclusion

Although the mechanisms regulating myogenin expression in response to exercise are not fully understood, the present findings suggest that both resistance training and creatine HCL supplementation may counteract age-related muscle atrophy by upregulating myogenin and HSP70 expression. This response may reflect enhanced hypertrophic and anabolic activity in skeletal muscles of aged individuals. However, additional studies are required to explore other cellular signaling pathways involved in protein synthesis and muscle hypertrophy following resistance training. Further research on training type, intensity, duration, and recovery in elderly populations is recommended to optimize resistance training as an effective intervention against sarcopenia.

### Originality/Value

This study provides new insights into the combined effects of resistance training and creatine hydrochloride supplementation on muscle aging. Unlike previous research using traditional creatine monohydrate, this study focuses on creatine HCL and its influence on the expression of HSP70 and myogenin genes in aged rats, highlighting its potential to counteract sarcopenia through molecular and cellular adaptations.

### Research Limitations/Implications

This study was limited to aged male rats and a short intervention period. Future research should include both sexes, longer durations, and more biomarkers to confirm the protective effects of resistance training and creatine HCL on muscle aging.

### Ethical Considerations

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and conducted in accordance with the ethical standards for the care and use of laboratory animals.

### Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Authors' contribution

The sole author was responsible for the study design, data collection, analysis, and manuscript preparation.

### Conflict of interest

The author declares no conflict of interest related to this study.

### Acknowledgments

The author gratefully acknowledges the Research and Laboratory support provided by the Academic Center for Education, Culture, and Research (ACECR), Tabriz Branch during this study.

### References

- 1- Eghbali E, Arazi H, Suzuki K. Supplementing With Which Form of Creatine (Hydrochloride or Monohydrate) Alongside Resistance Training Can Have More Impacts on Anabolic/Catabolic Hormones, Strength and Body Composition?. *Physiological Research*. 2024 Oct 30;73(5):739.
- 2- Barik P, Kuo WW, Kuo CH, Hsieh DJ, Day CH, Daddam J, Chen MY, Padma VV, Shibu MA, Huang CY. Rewiring of IGF1 secretion and enhanced IGF1R signaling induced by co-chaperone carboxyl-terminus of Hsp70 interacting protein in adipose-derived stem cells provide augmented cardioprotection in aging-hypertensive rats. *Aging (Albany NY)*. 2023 Dec 12;15(23):14019.
- 3- Bouri MZ, Agha-Alinejad H, Bouri SZ, Daneshmandi S. The effects of the combination of resistance exercise and heat stress on cell production and plasma levels of cytokines. *SPORT TK-Revista EuroAmericana de Ciencias del Deporte*. 2024 Jan 1;13:1.
- 4- Dam TV, Dalgaard LB, Johansen FT, Bengtsen MB, Mose M, Lauritsen KM, Gravholt CH, Hansen M. Effects of transdermal estrogen therapy on satellite cell number and molecular markers for muscle hypertrophy in response to resistance training in early postmenopausal women. *European Journal of Applied Physiology*. 2023 Mar;123(3):667-81
- 5- De Lemos Muller CH, Schroeder HT, Farinha JB, Lopez P, Reischak-Oliveira Á, Pinto RS, de Bittencourt Júnior PI, Krause M. Effects of resistance training on heat shock response (HSR), HSP70 expression, oxidative stress, inflammation, and metabolism in middle-aged people. *Journal of physiology and biochemistry*. 2024 Feb;80(1):161-73
- 6- Fu JL, Zheng SY, Wang Y, Hu XB, Xiao Y, Wang JM, Zhang L, Wang L, Nie Q, Hou M, Bai YY. HSP90 $\beta$  prevents aging-related cataract formation through regulation of the charged multivesicular body protein (CHMP4B) and p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023 Aug 1;120(31):e2221522120
- 7- Ostojic SM, Rátgéber L. Creatine as a mitochondrial theranostic in predictive, preventive, and personalized medicine. *EPMA Journal*. 2025 Sep 1:1-3.
- 8- Mousavi M, Khajei R, Hossein Abadi MR, Barjaste Yazdi A. The effect of twelve weeks of resistance training and creatine hydrochloride supplementation on blood oxygen levels and fatigue in cognitive activities of middle-aged men. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2025 Jan 20;23(6):521-34.
- 9- Kukushkina IV, Makhnovskii PA, Zgoda VG, Kurochkina NS, Popov DV. Knockout of Hsp70 Genes Modulates Age-Related Transcriptomic Changes in Leg Muscles and Reduces the Locomotion Speed and Lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology*. 2024 Apr;58(2):233-45
- 10- Gajda-Bathelt M, Kwaterska K, Adasiewicz J, Kutylowska A, Kutylowski K, Kuna PJ, Chojniak AK, Benecka A, Janawa K, Tomaszek M. Creatine supplementation: bioavailability and effects on physical and cognitive performance. *Quality in Sport*. 2025 Jul 13;43:62359-
- 11- conditioned knockout (cKO) mice. *Advanced Exercise and Health Science*. 2024 Mar 29

## اثر هشت هفته تمرین مقاومتی و مکمل کراتین هیدروکلراید بر بیان ژن مایوژنین و HSP70 عضله سولئوس رت‌های نر سالمند

علیرضا نیکوزاده<sup>1\*</sup>

تاریخ دریافت: 1404/08/21

تاریخ بازنگری: 1404/12/04

تاریخ پذیرش: 1404/12/06

### چکیده

**هدف:** به نظر می‌رسد با افزایش سن، سرعت و میزان ساخت پروتئین‌های انقباضی و سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی عضلات کاهش می‌یابد. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده و مکمل کراتین هیدروکلراید بر بیان ژن مایوژنین و HSP70 عضله سولئوس رت‌های نر سالمند بود.

**روش‌شناسی:** 32 سر موش صحرایی نر 24 ماهه در 4 گروه کنترل، مکمل (کراتین HCL)، توام (تمرین مقاومتی + مکمل) و تمرین تقسیم شدند. تمرین مقاومتی شامل هشت هفته تمرین نردبان با شدت متوسط (70 درصد از MVCC) و پنج روز در هفته بود. در گروه‌های مکمل و توام 5 روز در هفته و به مدت 8 هفته، مکمل کراتین هیدروکلراید و به میزان 200 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوژ دریافت شد. مایوژنین و HSP70 با استفاده از روش Real-time PCR به دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری با تحلیل واریانس دوطرفه، یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار بیان ژن HSP70 و مایوژنین عضله سولئوس در گروه توام نسبت به گروه‌های مکمل و کنترل بود ( $p=0/001$ ). تفاوت معنی داری بین دو گروه کنترل و مکمل مشاهده نشد ( $p=0/158$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد افزایش HSP70 و مهار آپوپتوز عضلانی ناشی از سارکوپنی و افزایش عملکرد میتوکندری و همچنین تأثیر افزایش یافته مایوژنین بر هیپرتروفی عضلانی و ایجاد یک محیط آنابولیک برای رشد عضلات در سنین سالمندی نشان دهنده اهمیت تمرینات مقاومتی و مصرف مکمل کراتین هیدروکلراید در سنین سالمندی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین مقاومتی، کراتین هیدروکلراید، مایوژنین، HSP70 و سارکوپنی.

1. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد واحد بناب، بناب، ایران.

\* نشانی الکترونیک نویسنده مسئول: mmm@Nikoozade\_58@iau.ac.ir

استناد: نیکوزاده، علیرضا (1404). اثر هشت هفته تمرین مقاومتی و مکمل کراتین هیدروکلراید بر بیان ژن مایوژنین و HSP70 عضله سولئوس رت‌های نر سالمند. *نشریه سوخت و ساز و فعالیت ورزشی*، 15 (2)، 195 - 211

DOI: <https://doi.org/10.22124/jme.2026.32270.437>

### نوآوری پژوهش و پیام کلی

1. ترکیب تمرین مقاومتی با مکمل کراتین هیدروکلراید در مدل حیوانی سالمند بسیار کمتر مورد بررسی قرار گرفته است.
2. استفاده از کراتین هیدروکلراید (HCL) به جای کراتین مونوهیدرات رایج، که جذب بالاتر و عوارض گوارشی کمتر دارد.
3. تمرکز بر بیان ژن‌های مایوژنین و HSP70 در عضله سولئوس که شاخص‌های مهمی در رشد، ترمیم و استرس سلولی عضلات هستند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که تمرین مقاومتی، به‌ویژه در ترکیب با مصرف مکمل کراتین هیدروکلراید، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های مایوژنین و HSP70 در عضله سولئوس رت‌های نر سالمند می‌شود. این نتایج بیانگر آن است که تلفیق فعالیت بدنی منظم با مکمل‌یاری هدفمند می‌تواند پاسخ‌های مولکولی مرتبط با رشد، ترمیم و مقاومت عضلانی در شرایط پیری را تقویت کند. به‌طور کلی، پیام این

پژوهش آن است که تمرین مقاومتی همراه با کراتین هیدروکلراید می‌تواند به‌عنوان یک راهکار بالقوه در پیشگیری از تحلیل عضلات و بهبود کیفیت زندگی در دوران سالمندی مورد توجه قرار گیرد.

### مقدمه

در سالمندی روند تدریجی تخریب و تضعیف اعضای مختلف بدن تسریع و به دنبال آن عملکرد جسمانی فرد با افت شدیدی رو به رو می‌شود (20). از مهمترین تغییراتی که متناسب با افزایش سن و پیری در بدن انسان به وجود می‌آید، تحلیل و تخریب توده عضلانی و کاهش چشم‌گیر حجم و اندازه عضله اسکلتی است که به بیماری سارکوپنیا<sup>1</sup> معروف است (15). این بیماری باعث ناتوانی در انجام وظایف روزانه، کاهش کیفیت و امید به زندگی در این افراد می‌شود. علت کاهش توده و حجم عضلانی، کاهش سطح مقطع و تعداد تارهای عضلانی و همچنین کاهش واحدهای حرکتی می‌باشد. آتروفی عضلانی در شرایطی اتفاق می‌افتد که تجزیه پروتئین عضله بیشتر از سنتز پروتئین باشد. بنابراین هیپرتروفی<sup>2</sup> یا جبران آتروفی<sup>3</sup>، یک هدف برای سالمندان جهت بهبود شرایط عضلانی به حساب می‌آید و لذا درک سازوکارهای تنظیم توده عضلانی مهم است (17). مطالعات گوناگون علل و ابعاد متفاوتی را در آتروفی ناشی از کاهش موتونورون‌های واحدهای حرکتی تند انقباض ناشی از افزایش سن بررسی و تبیین کرده‌اند، اما براساس یافته‌های جدید، مهمترین علت آتروفی در این تارها در سالمندی را می‌توان معکوس شدن مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی مسئول هایپرتروفی در شرایط کاهش و قطع عصب‌دهی در مقایسه با شرایط عصب‌دهی نرمال دانست (4) که در این شرایط مهمترین مسیر سیگنالینگ مسئول هایپرتروفی یعنی HDAC4/5<sup>4</sup>. Dh23-Myogenin روندی معکوس در پیش گرفته و با کاهش تعداد و سطح مقطع این سلول‌ها و ایجاد پدیده سارکوپنیا از طریق افزایش بیان و میزان پروتئین‌های آتروفیک<sup>5</sup> MuRF1 و آتروژین<sup>6</sup> موجب شروع و تشدید آتروفی عضلانی می‌شود (19). مایوژنین عاملی است که از طریق تنظیم نمو سلول‌های عضلانی (تمایز مایوبلاست به مایوتیوب) در رشد عضلانی نقش دارد چرا که رشد و هایپرتروفی، تحت تأثیر عوامل مختلف تنظیمی مایوژنیک گوناگونی قرار دارد و عوامل رونویسی و عوامل تنظیمی میوژنیک نقش مهمی در فرآیند تمایز سلول‌های عضله اسکلتی از راه کنترل رونویسی پروتئین‌های ویژه ایفا می‌کند و مایوژنین از اعضای مهم خانواده عوامل تنظیمی میوژنیک می‌باشد (7). عملکرد نادرست و کاهش مایوژنین اثرات مهمی بر ارگان‌های مختلف دارد و با کاهش عملکرد مایوژن می‌تواند منجر به کند شدن فعالیت آن و تجمع لیپیدها و پروتئین‌ها شده و با تاثیر بر DNA، فعالیت ناقص می‌تواند منجر به افراد سالمند را تشدید می‌کند و بنابراین حفظ ظرفیت مایوژن می‌تواند در دوران سالمندی یک عامل کلیدی در جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های وابسته به سالمندی است (23). افزایش سن و کاهش میزان فعالیت بدنی، موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن<sup>7</sup>، کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش مکانیسم‌های آپوپتوزی منجر به استرس سلولی و ابتلا به بیماری‌های مرتبط با افزایش سن می‌شوند (6). در این میان یکی از مشخص‌ترین پاسخ‌ها به استرس سلولی، تولید پروتئین‌های شوک گرمایی (HSP) هستند. هدف از تولید این پروتئین‌ها برگرداندن هومئوستاز، ترمیم و حفاظت از سلول در برابر آسیب‌های بیشتر است (18). خانواده HSP70 با زنجیره‌های سنگین ایمنوگلوبین و کمپلکس‌های در حال همانند سازی DNA ترکیب و در نگهداری ساختمان و یا در تجزیه آنها

1 - Sarcopenia

2 - hypertrophy

3 - atrophy

4 - Histone Deacetylase 4/5 (HDAC4/5)

5 - . Muscle Ring-Finger Protein-1

6 - Atrogin-1

7 - Active oxygen species

بعد از استفاده شرکت می‌کنند (22). HSP70 در میتوکندری به تسهیل تاشدگی پروتئین کمک می‌کند و به دلیل نقش اساسی در پشتیبانی از عملکرد میتوکندری به عنوان یکی از مهمترین پروتئین‌ها برای بقای سلول به شمار می‌رود (9). سطوح mRNA HSP70 در افراد با عارضه سارکوپنیک در مقایسه با گروه کنترل طبیعی دو برابر کمتر گزارش شده است (13). در یک مطالعه پس از 20 دقیقه ایسکمی و به دنبال 30 دقیقه خونرسانی مجدد سطح mRNA HSP70 در عضله سولئوس موش صحرایی بدون تغییر باقی ماند (24). کاهش HSP70 در سلول‌های عضلانی منجر به تجزیه کمپلکس‌های بین چارونی Bak و Bax شده، آپوپتوز را القا و با انتشار و رها سازی سیتوکروم C، منجر به فعال سازی کاسپاز 3 و قطعه قطعه شدن DNA می‌شود (26). از آنجایی که HSP70 می‌تواند بر آپوپتوز سلول‌های عضلانی تأثیر بگذارد، تصور می‌شود این چارون در پاتوژنز نارسایی ناشی از افزایش سن در عضلات اسکلتی مشارکت می‌کند (10).

در حال حاضر، فعالیت ورزشی به عنوان اصلی ترین ابزار موثر برای مقابله با تحلیل عضلانی سالمندان به رسمیت شناخته شده است. با وجود این، فعالیت بدنی در افراد مسن اغلب با انواع شرایط محدود کننده و یا بیماری همراه است. به نظر می‌رسد فعالیت بدنی و به‌طور ویژه تمرین مقاومتی می‌تواند از کاهش توده عضلانی جلوگیری کند و حتی روند آن را معکوس سازد (2). انجام تمرینات مقاومتی توسط سالمندان، منجر به هیپرتروفی عضلانی در این افراد می‌شود. مکانیسم‌های احتمالی که منجر به افزایش عضله ناشی از تمرین مقاومتی در افراد سالمند می‌شود می‌تواند به دلیل افزایش سنتز پروتئین عضلانی، فعال سازی و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای باشد (28). افزون بر انواع متفاوت فعالیت بدنی، مداخلات درمانی نوآورانه در سال‌های اخیر برای درمان آتروفی ناشی از سارکوپنی بررسی شده است که یکی از آن‌ها، مداخلات تغذیه‌ای است. در این میان کراتین یکی از محبوب‌ترین مکمل‌های ورزشی در جهان است که نقش مهمی در افزایش قدرت، استقامت و ریکاوری عضلات دارد (1). دو شکل رایج آن شامل کراتین مونوهیدرات و کراتین هیدروکلراید (HCL) هستند که هرکدام ویژگی‌ها و مزایای خاص خود را دارند. کراتین مونوهیدرات به‌عنوان استاندارد طلایی شناخته می‌شود زیرا بیشترین تحقیقات علمی درباره آن انجام شده و اثربخشی و ایمنی آن به‌خوبی اثبات شده است (1). در مقابل، کراتین HCL با ساختاری متفاوت طراحی شده تا حلالیت و جذب بهتری داشته باشد و مشکلات گوارشی کمتری ایجاد کند (14).

کراتین HCL یا هیدروکلراید، فرم جدیدتری از کراتین است که به مولکول کراتین، اسید هیدروکلریک متصل شده است. این تغییر در ساختار شیمیایی باعث افزایش چشمگیر حلالیت آن در آب و در نتیجه جذب سریع‌تر در بدن می‌شود. به همین دلیل، دوز مصرفی این نوع کراتین بسیار کمتر از مونوهیدرات است و نیازی به دوره بارگیری ندارد (12). یکی از مهم‌ترین مزایای HCL، کاهش مشکلات گوارشی و نفخ است که برخی ورزشکاران هنگام مصرف مونوهیدرات تجربه می‌کنند. همچنین به دلیل عدم ایجاد احتباس آب زیاد، عضلات در عین افزایش قدرت، ظاهر حجیم‌تری نسبت به مونوهیدرات پیدا نمی‌کنند. همین ویژگی آن را برای کسانی که به دنبال افزایش عملکرد بدون تغییر زیاد در وزن یا ظاهر عضلات هستند، جذاب می‌سازد (6). موسوی و همکاران (2025) نشان دادند که تمرین مقاومتی و مصرف کراتین HCL منجر به تعویق خستگی در میانسالان می‌شود (6). اوستیج<sup>1</sup> و همکاران (2025) نیز نشان دادند دریافت کراتین HCL منجر به افزایش بیوژنز میتوکندریایی بافت عضله می‌شود (11). با وجود مزیت‌های فراوان فعالیت‌های ورزشی در سلامت فیزیولوژیک عضله اسکلتی افراد سالمند، تحقیقات بسیار اندکی در زمینه تأثیر فعالیت‌های ورزشی و مصرف مکمل کراتین HCL بر محتوای بافتی عضلانی مهم‌ترین پروتئین درگیر در فرایند سارکوپنیا در این

<sup>1</sup> - Ostojic



افراد صورت گرفته است و با توجه به نقش چپرون‌ها در بازسازی میتوکندری هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرین مقاومتی و مکمل کراتین هیدروکلراید بر بیان ژن مایوژنین و HSP70 عضله سولئوس رت‌های نر سالمند بود.

### روش‌شناسی

در پژوهش حاضر 32 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی 443/2 گرم در سن 24 ماهگی از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. آن‌ها در شرایط دمایی  $3 \pm 22$  درجه سانتیگراد در شرایط 12:12 ساعت تاریکی و روشنایی و رطوبت نسبی 30 تا 50 درصد نگهداری شدند و با غذای مخصوص رت صحرایی و آب تغذیه شدند. همچنین، همه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان) براساس انجمن ارزیابی و اعتباربخشی بین‌المللی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. بعد از گذشت 2 هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط آزمایشگاه، براساس وزن اولیه رت‌ها، به صورت تصادفی در 4 گروه کنترل، مکمل (کراتین HCL)، توام (تمرین مقاومتی + مکمل کراتین HCL) و تمرین (تمرین مقاومتی) قرار گرفتند. رت‌ها در هر دو گروه تمرین مقاومتی به منظور آشناسازی با نحوه اجرای پروتکل تمرینی، پنج روز بدون وزنه تمرین، بالا رفتن از نردبان را انجام دادند. پس از آخرین جلسه سازگاری، از حیوانات آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی<sup>1</sup> (MVCC) گرفته شد که به عنوان بیشترین بار حمل شده موفقیت‌آمیز تعریف شد (25). سپس هر دو گروه تمرین مقاومتی به مدت پنج جلسه در هفته و به مدت هشت هفته تمرین مقاومتی را انجام دادند. با توجه به سازگاری حیوانات با تمرین در انتهای هر چهار هفته، از حیوانات آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی گرفته شد و شدت تمرین حیوانات براساس آزمون جدید تعیین شد (25). پروتکل تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از یک نردبان تمرینی مخصوص (طول 110 سانتیمتر، شیب 80 درجه، 26 پله و دو سانتیمتر فضای بین هر پله) شامل بود. گروه‌های تمرینی هشت هفته تمرین مقاومتی نردبان را در 80 درصد از MVCC، نه تا ده بار بالا رفتن در هر جلسه و پنج روز در هفته انجام دادند. برای تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی، وزنه ای دارای 75 درصد وزن بدن حیوان به دمش متصل شد و حیوان شروع به بالا رفتن از نردبان با حمل این بار کرد. سپس، به ازای هر تکرار موفق 30 گرم به بار تمرینی تکرار شده قبلی اضافه شد. در بالای نردبان دو دقیقه استراحت بین هر صعود وجود داشت. این روش تا زمانی تکرار شد که موش به صعود کل طول نردبان در سه تلاش متوالی موفق می‌شد (25). رت‌های صحرایی در گروه مکمل و توام در زمان‌های مشابه با تمرین (5 روز در هفته به مدت 8 هفته)، مکمل کراتین HCL دریافت نمودند این مکمل بعد از تمرین و به میزان 200 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن گاوآژ شد (25).

### جراحی حیوانات آزمایشگاهی و استخراج نمونه

تمامی رت‌های صحرایی، 24 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، توسط تزریق درون‌صفاقی کتامین (90 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش، جراحی انجام و و استخراج بافت آغاز شد. بافت عضله نعلی نمونه برداری شده پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های 1/8 حاوی مایع RNA later™ با نسبت ۲۰ درصد غوطه ور گردیده و جهت انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای اندازه‌گیری مقدار HSP70 ابتدا معرف TRIZOL برای به دست آوردن ریبونوکلیک اسید از نمونه‌های بافت عضله نعلی استفاده و مقدار پنج نانومول بر لیتر از *Caenorhabditis Elegans* HSP70 (cel-HSP70) ساخت شرکت applied biosystem به تمام نمونه‌های بافت عضله نعلی اضافه شد. سپس آنالیز

<sup>1</sup> - Maximum Voluntary Carrying Capacity

اسپکتوفتومتری در طیف 260 نانومتر برای ارزیابی غلظت نهایی ریبونوکلیک اسید موجود در هر نمونه انجام و پس از آن نمونه های موجود در دمای 80- درجه سانتیگراد فریز شدند. مقدار بیان HSP70 و مایوژنین در زمان تحلیل با استفاده از معرف Applied Biosystems, Foster City, CA, USA و پرایمر TaqMan miRNA qRT-PCR تعیین شد. برای اندازه گیری مقدار HSP70 و مایوژنین بافت عضله نعلی به وسیله تکنیک Real-time PCR با استفاده از PCRmaster mix (Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه (Applied Biosystems, Sequence ABI Step One Detection Systems. Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. به طور ویژه، میزان بیان mRNA نسبی از حاصل تفریق Ct مربوط به U6 snRNA از Ct مربوط به mRNA مدنظر به دست آمد که باز از مقدار به دست آمده در نمونه مرجع کسر شد و cDNA با پرایمرهای مخصوص برای ژن های HSP70 تکثیر شد. fold change با استفاده از معادله  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد (12). برای تجزیه و تحلیل داده ها، ابتدا از طبیعی بودن توزیع داده ها به کمک آزمون شاپیرو-ویلک اطمینان حاصل شد. در ادامه برای مقایسه بین گروهی داده ها پس از پایان مداخله، از تحلیل واریانس عاملی  $2 \times 2$  استفاده شد که در صورت معنی دار شدن یکی از عامل ها و تأثیر تعاملی آن ها مقایسه بین گروهی داده ها با استفاده از تحلیل واریانس تکراره انجام شد. همچنین در ادامه برای مقایسه دویه دوی گروه ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در تمام آزمون ها سطح اطمینان آماری 95 درصد در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

در شروع تحقیق تفاوت معنی داری بین میانگین وزنی گروه های مورد مطالعه وجود نداشت اما وزن بدن رت های صحرایی در هر دو گروه تمرین مقاومتی بر خلاف دو گروه مکمل و کنترل در طول پژوهش با کاهش همراه بود ( $P \leq 0.001$ ).

جدول 1. ویژگی های موش های نر صحرایی در گروه های پژوهش

Table 1. Characteristics of male rats in research groups

توام	تمرین	مکمل	کنترل	
451/65±23/6	447/65±23/6	440/78±22/3	421/25±20/3	وزن ابتدایی پژوهش Weight (g)
413/68±17/5	421/68±17/5	480/25±18/7	487/13±23/5	وزن انتهایی پژوهش Weight (g)
0/30±0/08	0/31±0/08	0/38±0/05	0/39±0/06	وزن عضله نعلی Weight (g)
24/22	24/22	24/22	24/22	دریافت غذا در روز (gr)

تحلیل واریانس دوراهه برای مقایسه بیان ژن HSP70 و مایوژنین میتوکندری رت های صحرایی در 4 گروه پژوهش تفاوت معنی داری را نشان داد ( $p=0/001$ ). نتایج آزمون تعقیبی بیانگر افزایش معنی دار بیان ژن HSP70 و مایوژنین عضله نعلی موش های نر صحرایی در گروه توام و تمرین به نسبت گروه های مکمل و کنترل بود ( $p=0/001$ ). با این وجود گروه توام برتری داشت. همچنین تفاوت معنی داری بین دو گروه کنترل و مکمل مشاهده نشد ( $p=0/105$ ).

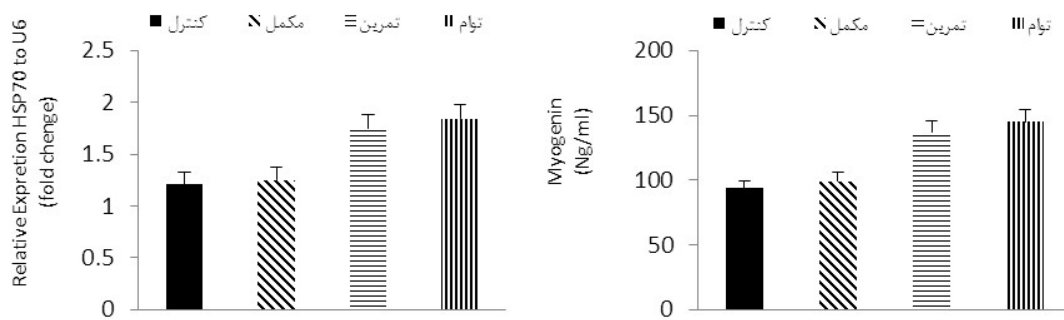
جدول 2. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه

Table 2. One-way ANOVA test results

Sig	F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مجذورات	ANOVA
		3/021	3	5/32	HSP70 درون گروهی

* 0/001	9/39	1/09	30	4/12	بین گروهی	مایوژنین (Ng/ml)
		-	32	10/22	کل	
* 0/001	64/39	3/158	3	3201/52	درون گروهی	
		1/28	30	189/12	بین گروهی	
		-	32	3390/64	کل	

\* تفاوت معنی دار



شکل 1. میانگین بیان ژن HSP70 میتوکندری و مایوژنین سرمی در هر چهار گروه پژوهش.

**Figure 1. Average mitochondrial HSP70 gene expression and serum myogenin in all four study groups**

## بحث

نتایج پژوهش حاضر بیانگر افزایش معنی‌دار بیان ژن HSP70 عضله نعلی موش‌های نر صحرایی در گروه توام و تمرین به نسبت گروه‌های مکمل و کنترل بود ( $p=0/001$ ). در تأیید نتایج پژوهش حاضر، رابرت<sup>1</sup> و همکاران (2024) نشان دادند که 12 هفته تمرین مقاومتی با شدت متوسط موجب افزایش معنی‌دار بیان HSP70 و کاهش قطعه قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالخورده می‌شود. این پژوهشگران عنوان داشتند که افزایش قابل توجه بیان HSP70 متعاقب تمرین مقاومتی با کاهش عوامل پیش‌آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت بیان پروتئین Bax به Bcl-2 و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 همراه بود. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین در موش‌های سالخورده احتمالاً با کاهش ره‌ایش عوامل آپوپتوتیک مانند پروتئین C و Apaf-1<sup>2</sup> همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز-3 شده است (22). سالمندی با از دست دادن پیش‌رونده-ای از توده و قدرت عضلانی اسکلتی همراه است که منجر به کاهش توانایی عملکرد و افزایش خطر پیشرفت ابتلا به بیماری متابولیکی مزمن می‌شود. این کاهش در اندام‌های پایین‌تر برجسته است. در سطح بافت عضله، عضله پیر با کاهش تار عضلانی، آتروفی تار عضلانی و گروه بندی انواع تار مشخص شده است (15). پژوهش‌های قبلی کاهش 40-25 درصدی در سطح مقطع عرضی عضلات ران را در طول زندگی گزارش کرده‌اند (21). چندین مکانیزم مطرح شده-اند تا نقش خود را در علت از دست دادن عضلات، در ارتباط به سن نشان دهند. با این وجود هنوز مشخص نشده است که این مکانیسم‌ها منجر به از دست رفتن تار عضلانی می‌شود یا آتروفی (11). در طی آسیب ایسکمی که در وضعیت متعاقب سارکوپنیا روی می‌دهد، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و افزایش پروتئین‌های شوک گرمایی گردش خون و التهاب، به باز شدن منافذ نفوذپذیر میتوکندری منجر می‌شوند که این امر می‌تواند به کاهش ATP، اکسیداسیون برگشت ناپذیر پروتئین، چربی و DNA منجر شود و فرایند آپوپتوز را شروع کند (23). یکی از مکانیسم‌هایی که ممکن است تا حدی تأثیر پیشگیرانه تمرین قدرتی در محافظت از میتوکندری عضلات اسکلتی را توضیح دهد، افزایش پروتئین‌های شوک گرمایی است. به عنوان مثال، به دنبال تمرینات قدرتی، افزایش HSP70 در عضلات گزارش شده است (26). همسو با این نتایج، بوری<sup>3</sup> و همکاران (2024) نشان دادند هشت هفته تمرینات مقاومتی در افراد سالمند موجب کاهش معنادار نسبت کاسپاز-1 به کاسپاز-3 می‌شود (3). همچنین زنگ<sup>4</sup> و همکاران (2024) بیان کردند هشت هفته تمرینات مقاومتی در افراد سالمند موجب کاهش معنادار نسبت کاسپاز-1 به پروکاسپاز و همچنین کاهش میزان Bcl-2 و کاسپاز-3 می‌شود. این پژوهشگران نشان دادند که تمرینات مقاومتی به طور کلی موجب کاهش فرایند آپوپتوز در افراد سالمند می‌شود (12). در این راستا، سیگنالینگ گیرنده  $\beta$ -آدرنژیک یک تنظیم کننده مهم القای HSP70 پس از یک دوره تمرین مقاومتی است که با کاهش پروتئین کیناز PKA، افزایش ناشی از ورزش را از طریق فعالسازی HSF1 تنظیم می‌کند (12). پس از تمرین ورزشی، کاهش برون‌ده سمپاتیک که با برادری ناشی از تمرین در حالت استراحت مشاهده می‌شود، همراه است و تصور می‌شود افزایش بیان HSP70 متعاقب تمرین

<sup>1</sup> Song<sup>2</sup> Apoptotic protease activating factor-1<sup>3</sup> - Bouri<sup>4</sup> - Zeng



قدرتی حاصل کاهش برونده سمپاتیک باشد (23). همچنین، افزایش بیان ژن HSP70 ناشی از تمرین مقاومتی و مصرف مکمل کراتین هیدروکلراید مسیرهای آپوپتوز وابسته به کاسپاز را از طریق اتصال فاکتور فعال کننده پروتئاز آپوپتوز تعدیل می‌کند و از تشکیل آپوپتوز عملکردی، مجموعه فعال سازی Apaf/1 سیتوکروم C/caspase/9 جلوگیری می‌کند (29). علاوه بر این در شرایط استرس عواملی مثل گلوکوکورتیکوئیدها و سایتوکین‌ها با ایجاد استرس در میتوکندری، موجب تغییراتی در نفوذپذیری آن می‌شوند و سیتوکروم C که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد، به داخل سیتوزول آزاد و به فاکتور 1 پروتئاز فعال کننده آپوپتوزیس (Apaf-1) متصل و ترکیبی به نام dATP تشکیل می‌دهد. سپس این ترکیب، از طریق فعال سازی پروکاسپاز 9، کاسپاز 9 و کاسپاز 3 موجب آپوپتوزیس می‌شود (4).

یافته‌های دیگر پژوهش حاضر اشاره به افزایش معنی‌دار بیان ژن مایوژنین در دو گروه تمرین و توام بود که گروه توام مزیت داشت و تفاوتی نیز در گروه‌های مکمل و کنترل وجود نداشت. دم<sup>1</sup> و همکاران (2023) به بررسی تأثیر هورمون درمانی بر بیان ژن مایوژنیک در زنان یائسه پرداخته است. زنان یائسه در دو گروه هورمون درمانی + فعالیت ورزشی و فعالیت ورزشی تقسیم شده و مجموعه 10 تکراری حرکت کشش پا را انجام دادند. در پاسخ به مداخله، مایوژنین به‌طور معنی‌داری در هر دو گروه افزایش یافت که موافق با مطالعه حاضر است (5). در مطالعه انجام شده در زمینه تأثیر فعالیت ورزشی در کاهش قدرت توده عضلانی مشخص شد که تمرین مقاومتی نسبت به تمرین هوازی تأثیر بیشتری در جلوگیری از افت قدرت عضلانی در سالمندی را دارد. همچنین انجام فعالیت ورزشی و مصرف پروتئین باعث کند شدن روند آتروفی عضلانی در سالمندی می‌شود که موافق با مطالعه حاضر است (27). بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ وجود دارد که از طریق آن miRNA ها بر میوژنز و متابولیسم عضلانی تأثیر می‌گذارند. به خوبی مشخص شده است که مسیر سیگنالینگ IGF-1 نقش‌های حیاتی مثبت در رشد عضلات ایفا می‌کند و مایوژنین مسیری را که موجب سرکوب رشد می‌شود را غیرفعال می‌کند و یا موجب هایپر تروفی عضلانی می‌شود (7). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی مقاومتی به افزایش مایوژنین افراد جوان منجر می‌شود و علت آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی، به عنوان محرک منجر به بازسازی عضلات و در نتیجه افزایش این عامل تنظیمی ذکر شده است (13). علت بعدی مورد بحث در خصوص نتایج این پژوهش، افزایش احتمالی بیان مایوستاتین در اثر افزایش سن و نیز مداخلات درمانی تمرین مقاومتی و مصرف مکمل کراتین و تأثیر مهار کننده آن بر مایوژنز و عوامل مایوژنیک وابسته به آن می‌باشد که در این پژوهش سنجیده نشده است. افزایش بیان مایوستاتین در نتیجه تمرین مقاومتی و مصرف مکمل کراتین هیدروکلراید می‌تواند ریشه در رابطه تعادلی میان نسبت مایوستاتین و فولیستاتین خون داشته باشد (14). به نظر می‌رسد افزایش غلظت مایوژنین که می‌تواند بر اثر مصرف مکمل و یا تحریک افزایش ترشح IGF1 بر اثر تمرینات مقاومتی صورت پذیرد؛ به صورت بازخورد متقابل، بدن را وادار به بیان کمتر مایوستاتین جهت برقراری تعادل آنابولیکی و کاتابولیکی کرده و از این طریق از میزان مهارکنندگی آن جلوگیری به عمل آورد (13). در نهایت اینکه سازوکار دیگر احتمالی افزایش بیان مایوژنین در گروه توام می‌تواند ناشی از ساختار شیمیایی کراتین هیدروکلراید باشد که گفته شده

<sup>1</sup> - Dam

است به سبب ساختار شیمیایی اش ممکن است مایوستاتین آزاد خون را مهار و سبب تولید عوامل مایوژنیک شود (23).

### نتیجه‌گیری کلی و پیام مقاله

عوامل تعیین کننده افزایش مایوژین در پاسخ به تمرینات ورزشی به درستی شناخته نشده‌اند، با این حال، افزایش بیان مایوژین در هر دوی تمرینات مقاومتی با و بدون مکمل کراتین هیدروکلراید می‌تواند زمینه را برای استفاده بیشتر از این دو متغیر تعیین کننده به جهت برگشت جبرانی آتروفی عضلانی ناشی از سالمندی فراهم نماید. این احتمال وجود دارد که افزایش مایوژین با تمرین قدرتی بیانگر تأثیر بر هیپرتروفی و ایجاد یک محیط آنابولیک عضلانی باشد. هر چند که با توجه به نتایج تحقیق حاضر و میسر شدن نتایج مثبت این احتمال وجود دارد که کاهش آتروفی عضلانی در افراد سالمند می‌تواند از طریق دیگر مسیرهای سنتز پروتئین و هیپرتروفی عضلانی نیز باشد. اندازه‌گیری تأثیر دیگر مسیرهای سلولی به دنبال تمرین مقاومتی می‌تواند درک درستی از سازوکارهای سلولی آشکار کند؛ بنابراین، تمرین مقاومتی به عنوان یک مداخله ورزشی برای سالمندان هنوز ناشناخته است و نیاز به تحقیقات بسیار در زمینه انواع، مدت زمان، شدت، تکرار و زمان ریکاوری این نوع تمرینات دارد.

### محدودیت‌ها

از جمله محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به استفاده از مدل حیوانی اشاره کرد که ممکن است تعمیم‌پذیری نتایج به انسان، به‌ویژه سالمندان را با محدودیت همراه سازد. همچنین دوره‌ی هشت‌هفته‌ای مداخله ممکن است برای مشاهده‌ی تمامی سازگاری‌های فیزیولوژیکی و مولکولی ناشی از تمرین مقاومتی و مکمل‌یاری کافی نباشد. عدم بررسی سطوح پروتئینی مایوژین و HSP70 در کنار بیان ژنی آن‌ها نیز یکی دیگر از محدودیت‌هاست که مانع از نتیجه‌گیری دقیق درباره‌ی تغییرات عملکردی می‌شود. افزون بر این، عدم اندازه‌گیری سایر شاخص‌های عملکرد عضلانی مانند قدرت، استقامت یا ترکیب بدنی، می‌تواند درک جامع‌تری از اثرات مداخله را محدود کند. در نهایت، تفاوت‌های فردی میان نمونه‌ها و کنترل‌نشدن کامل شرایط محیطی ممکن است بر نتایج اثرگذار باشد.

### پیشنهاد برای مطالعات آتی

با توجه به محدودیت‌های این مطالعه، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده اثرات تمرین مقاومتی و مکمل کراتین هیدروکلراید در مدل‌های انسانی سالمند بررسی شود تا امکان تعمیم نتایج افزایش یابد. همچنین توصیه می‌شود دوره‌ی مداخله طولانی‌تر و با شدت‌های مختلف تمرین طراحی گردد تا روند سازگاری‌های مولکولی و عملکردی در طول زمان مشخص شود. بررسی سطوح پروتئینی مایوژین و HSP70 در کنار بیان ژنی، و نیز ارزیابی شاخص‌های عملکرد عضلانی و ترکیب بدنی می‌تواند تصویر کامل‌تری از پاسخ‌های فیزیولوژیکی ارائه دهد. علاوه بر این، مطالعه‌ی اثرات انواع دیگر مکمل‌های کراتین یا ترکیب آن‌ها با سایر مواد تغذیه‌ای (مانند بتا‌آلانین یا ویتامین D) می‌تواند به شناسایی راهکارهای بهینه برای حفظ توده عضلانی در سالمندان کمک کند. در نهایت، بررسی مکانیسم‌های سلولی و سیگنالینگ درون‌سلولی مرتبط با تنظیم مایوژین و HSP70 می‌تواند درک عمیق‌تری از سازوکارهای حفاظتی عضلات در برابر پیری فراهم آورد.

### ملاحظات اخلاقی

تمامی مراحل اجرای این پژوهش مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و بر اساس دستورالعمل‌های کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی ایران انجام شد. پروتکل‌های تمرینی، مکمل‌یاری و نمونه‌برداری به‌گونه‌ای طراحی و اجرا

گردید که کمترین میزان استرس و آسیب به حیوانات وارد شود. حیوانات در شرایط استاندارد دما، نور و تغذیه نگهداری شدند و به صورت منظم از نظر سلامت عمومی مورد پایش قرار گرفتند. تمامی مراحل این تحقیق پیش از اجرا، در کمیته اخلاق پژوهش جهاد دانشگاهی تبریز مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. بدین ترتیب، کلیه موازین اخلاقی و اصول رفاه حیوانات آزمایشگاهی در طول پژوهش رعایت شده است

#### منابع مالی

در اجرای این پژوهش هیچ گونه کمک مالی از هیچ سازمان و ارگانی دریافت نشده است.

#### مشارکت نویسندگان

تمام مراحل اجرای پژوهش، شامل طراحی مطالعه، انجام مداخلات تمرینی و تغذیه‌ای، جمع‌آوری و تحلیل داده‌ها، تفسیر نتایج و نگارش مقاله، به‌طور کامل توسط نویسنده انجام شده است. نویسنده مسئولیت کامل صحت و تمامیت علمی محتوای این مقاله را بر عهده دارد.

#### تعارض منافع

نویسنده بدین‌وسیله اعلام می‌دارد که هیچ‌گونه تعارض منافع مالی، شخصی یا سازمانی مرتبط با موضوع این پژوهش وجود ندارد. تمامی مراحل طراحی، اجرا، تحلیل داده‌ها و نگارش مقاله به‌صورت مستقل و بدون هرگونه حمایت یا تأثیرگذاری بیرونی انجام شده است.

#### تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از اساتید و مدیریت جهاد دانشگاهی تبریز که در انجام این مطالعه کمال همکاری را داشته‌اند سپاسگزاری می‌گردد.

#### References

1. Eghbali E, Arazi H, Suzuki K. Supplementing With Which Form of Creatine (Hydrochloride or Monohydrate) Alongside Resistance Training Can Have More Impacts on Anabolic/Catabolic Hormones, Strength and Body Composition?. *Physiological Research*. 2024 Oct 30;73(5):739.
2. Barik P, Kuo WW, Kuo CH, Hsieh DJ, Day CH, Daddam J, Chen MY, Padma VV, Shibu MA, Huang CY. Rewiring of IGF1 secretion and enhanced IGF1R signaling induced by co-chaperone carboxyl-terminus of Hsp70 interacting protein in adipose-derived stem cells provide augmented cardioprotection in aging-hypertensive rats. *Aging (Albany NY)*. 2023 Dec 12;15(23):14019.
3. Bouri MZ, Agha-Alinejad H, Bouri SZ, Daneshmandi S. The effects of the combination of resistance exercise and heat stress on cell production and plasma levels of cytokines. *SPORT TK-Revista EuroAmericana de Ciencias del Deporte*. 2024 Jan 1;13:1.
4. Cheng TY, Wu WT, Peng CH, Liu KL, Yao TK, Yu TC, Chen H, Yeh KT. Effect of aerobic exercise on bone health in postmenopausal women with obesity: Balancing benefits with caloric restriction and resistance exercise. *Tzu Chi Medical Journal*. 2024;10-4103
5. Dam TV, Dalgaard LB, Johansen FT, Bengtson MB, Mose M, Lauritsen KM, Gravholt CH, Hansen M. Effects of transdermal estrogen therapy on satellite cell number and molecular markers for muscle hypertrophy in response to resistance training in early postmenopausal women. *European Journal of Applied Physiology*. 2023 Mar;123(3):667-81
6. Clarke HE, Akhavan NS, Behl TA, Ormsbee MJ, Hickner RC. Effect of creatine monohydrate supplementation on macro-and microvascular endothelial function in older adults: A pilot study. *Nutrients*. 2025 Jan;17(1):58.
7. De Carvalho MR, Duarte EF, Mendonça ML, de Moraes CS, Ota GE, Gaspar-Junior JJ, de Oliveira Filiú WF, Damatto FC, Okoshi MP, Okoshi K, Oliveira RJ. Effects of Creatine

- Supplementation on the Myostatin Pathway and Myosin Heavy Chain Isoforms in Different Skeletal Muscles of Resistance-Trained Rats. *Nutrients*. 2023 May 8;15(9):2224
8. De Lemos Muller CH, Schroeder HT, Farinha JB, Lopez P, Reischak-Oliveira Á, Pinto RS, de Bittencourt Júnior PI, Krause M. Effects of resistance training on heat shock response (HSR), HSP70 expression, oxidative stress, inflammation, and metabolism in middle-aged people. *Journal of physiology and biochemistry*. 2024 Feb;80(1):161-73
  9. Escobar KA, VanDusseldorp TA, Johnson KE, Stratton M, McCormick JJ, Moriarity T, Dokladny K, Vaughan RA, Kerksick CM, Kravitz L, Mermier CM. The biphasic activity of autophagy and heat shock protein response in peripheral blood mononuclear cells following acute resistance exercise in resistance-trained males. *European Journal of Applied Physiology*. 2024 May 21:1-2
  10. Fu JL, Zheng SY, Wang Y, Hu XB, Xiao Y, Wang JM, Zhang L, Wang L, Nie Q, Hou M, Bai YY. HSP90 $\beta$  prevents aging-related cataract formation through regulation of the charged multivesicular body protein (CHMP4B) and p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023 Aug 1;120(31):e2221522120
  11. Ostojic SM, Rátgéber L. Creatine as a mitochondrial theranostic in predictive, preventive, and personalized medicine. *EPMA Journal*. 2025 Sep 1:1-3.
  12. Mousavi M, Khajei R, Hossein Abadi MR, Barjaste Yazdi A. The effect of twelve weeks of resistance training and creatine hydrochloride supplementation on blood oxygen levels and fatigue in cognitive activities of middle-aged men. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2025 Jan 20;23(6):521-34.
  13. Kukushkina IV, Makhnovskii PA, Zgoda VG, Kurochkina NS, Popov DV. Knockout of Hsp70 Genes Modulates Age-Related Transcriptomic Changes in Leg Muscles and Reduces the Locomotion Speed and Lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology*. 2024 Apr;58(2):233-45
  14. Gajda-Bathelt M, Kwaterska K, Adasiewicz J, Kutylowska A, Kutylowski K, Kuna PJ, Chojniak AK, Benecka A, Janawa K, Tomaszek M. Creatine supplementation: bioavailability and effects on physical and cognitive performance. *Quality in Sport*. 2025 Jul 13;43:62359-.
  15. Li G, Li Z, Liu J. Amino acids regulating skeletal muscle metabolism: mechanisms of action, physical training dosage recommendations and adverse effects. *Nutrition & Metabolism*. 2024 Jul 2; 21(1):41
  16. Liao Y, Peng Z, Chen L, Zhang Y, Cheng Q, Nüssler AK, Bao W, Liu L, Yang W. Prospective views for whey protein and/or resistance training against age-related sarcopenia. *Aging and disease*. 2019 Feb; 10(1):157
  17. Mcleod JC, Currier BS, Lowisz CV, Phillips SM. The influence of resistance exercise training prescription variables on skeletal muscle mass, strength, and physical function in healthy adults: An umbrella review. *Journal of sport and health science*. 2024 Jan 1;13(1):47-60
  18. Mei T, Hu Y, Zhang Y, Li Y. Hypoxia treatment and resistance training alters microRNA profiling in rats skeletal muscle. *Scientific Reports*. 2024 Apr 10;14(1):8388
  19. Moradiani H, Zolfaghari MR, Khodaei K. Comparison of the efficacy of 12 Weeks of Resistance and Combined Training on Activation of AMPK Signaling and Gene Expression of Muscle Atrophy markers in Middle-Aged Women. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2024 Jun 9
  20. O'Bryan SM, Lavin KM, Graham ZA, Drummer DJ, Tuggle SC, Van Keuren-Jensen K, Reiman R, Alsop E, Kadakia MP, Craig MP, Zhang J. Muscle-Derived microRNAs



- Correlated with Thigh Lean Mass Gains during Progressive Resistance Training in Older Adults. *Journal of Applied Physiology*. 2024 Jun 27
21. Pryor JL, Sweet D, Rosbrook P, Qiao J, Hess HW, Looney DP. Resistance Training in the Heat: Mechanisms of Hypertrophy and Performance Enhancement. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 2024 Jul 1; 38(7):1350-7
  22. Roberts MD, Ruple BA, Godwin JS, McIntosh MC, Chen SY, Kontos NJ, Agyin-Birikorang A, Michel M, Plotkin DL, Mattingly ML, Mobley B. A novel deep proteomic approach in human skeletal muscle unveils distinct molecular signatures affected by aging and resistance training. *Aging (Albany NY)*. 2024 Apr 4;16(8):6631
  23. Shafabakhsh SR, Kazemzadeh Y, Shirvani H, Shanjani SM, Sedaghati S. Investigating the Impact of Resistance Training on Myokines Gene Expression in the Skeletal Muscle of Rats. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2024 May 26
  24. SHIN J. The role of microRNA-140 in the regulation of skeletal muscle mass and function (Doctoral dissertation, Waseda University)
  25. Wideman C, Iemma A, Janolo O, Kalinina A, Murphy H. Effect of Creatine hydrochloride on Spatial Working Memory, Body Weight, and Food Intake in Male and Female Rats. *Nutrients*. 2025 Jul 4;17(13):2218.
  26. Xie Y, Huang J, Chen Y. Exogenous recombinant Hsp70 attenuates sevoflurane anesthesia-induced cognitive dysfunction in aged mice. *Brain and Behavior*. 2023 Jan;13(1):e2861
  27. Yan X, Fu P, Zhang Y, Ling D, Reynolds L, Hua W, Wang Z, Ma F, Li B, Yu J, Liu Y. MCC950 Ameliorates Diabetic Muscle Atrophy in Mice by Inhibition of Pyroptosis and Its Synergistic Effect with Aerobic Exercise. *Molecules*. 2024 Feb 4;29(3):712
  28. Zayed M, Kim YC, Jeong BH. Assessment of the therapeutic potential of Hsp70 activator against prion diseases using in vitro and in vivo models. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2024 Jul 22;12:1411529
  29. Zeng Z, Zhang H, Liang J, Lv J, Wu L, Chen N. Resistance exercise exacerbates muscle atrophy of skeletal muscle-specific Beclin1 conditioned knockout (cKO) mice. *Advanced Exercise and Health Science*. 2024 Mar 29
  30. Zhao YC, Wu YY. Resistance training improves hypertrophic and mitochondrial adaptation in skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine*. 2023 Jul;44(09):625-33