فیزیولوژی ورزشی شماره ۴۲، تابستان ۱۳۹۸. صص ۷۸-۶۱

تأثیر شدت‌های مختلف تمرین مقاومتی و استقامتی بر بیان microRNA-133a و دو فاکتور نسخه‌برداری استئوژنز و آدیپوژنز Runx2 و PPARγ در مغز استخوان موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار

زهرا همتی فارسانی[۱]، ابراهیم بنی‌طالبی[۲]، محمد فرامرزی[۳]، امین بیغم صادق[۴]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران*
۳. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. استاد علوم درمانگاهی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

چکیده

هدف از انجام مطالعهٔ حاضر، تأثیر شدت‌های مختلف تمرین مقاومتی و استقامتی بر بیان microRNA-133a (mir-133a)، RUNX2 و گیرندهٔ فعال‌کنندهٔ تکثیر پروکسی زوم گاما (PPARγ) در مغز استخوان موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار بود. ۴۰ سر موش صحرایی نر سالمند (میانگین سنی: ۲۳ ماه، میانگین وزن: ۴۳۸/۲۷ گرم) نژاد ویستار به پنج گروه مساوی هشت‌تایی شامل تمرین‌های مقاومتی و استقامتی با شدت متوسط و شدید و گروه کنترل به‌طور تصادفی تقسیم شدند. تمرین‌های مقاومتی متوسط و شدید به‌ترتیب با شدت ۶۰ درصد و ۸۰ درصد حداکثر ظرفیت حمل ارادی با استفاده از نردبان مقاومتی، تمرین استقامتی با شدت متوسط ۷۰-۶۰ درصد سرعت بیشینه و تمرین استقامتی با شدت شدید ۱۱۰-۸۰ درصد سرعت بیشینه، با استفاده از تردمیل جوندگان انجام شدند و هر دو نوع تمرین پنج روز در هفته به‌مدت هشت هفته انجام شدند. بعد از پایان دورهٔ تمرین، بیان mir-133a، RUNX2 و PPARγ در بافت مغز استخوان تیبیا به روش RT–PCR اندازه‌گیری شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از آزمون کروسکال والیس در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد. این پژوهش نشان داد که میزان بیان mir-133a ($P = 0.197$)، Runx2 ($P = 0.960$) و PPARγ ($P = 0.872$) در گروه‌های تمرینی با شدت بالا و متوسط در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت؛ بنابراین، به‌نظر می‌رسد که تغییرات سلولی متابولیسم استخوان پس از انجام چنین تمرین‌هایی به دوره‌های طولانی‌تر تمرین ورزشی یا اندازه‌گیری‌های دیگری به‌ویژه در سطح پروتئومیکس نیاز دارد که باید در پژوهش‌های آینده بررسی شود.

واژگان کلیدی: mir-133a، RUNX2، PPARγ، تمرین استقامتی و مقاومتی، متابولیسم استخوان

*نویسندهٔ مسئول Email: banitalebi.e@gmail.com

مقدمه

بافت استخوانی اندامی زنده، پویا و پیچیده در پاسخ به فعالیت بدنی و بارگیری مکانیکی مانند تمرین‌های ورزشی است (۱). تودۀ استخوانی حدود ۱۱ درصد و ۱۴ درصد از کل تودۀ بدن در زنان و مردان است (۲). به‌نظر می‌رسد که مکانیسم‌های مرتبط با افزایش شدت ازدست‌دادن استخوان در مردان سالمند، با زنان یائسه سالمند متفاوت هستند (۳). سالمندی باعث کاهش قابل‌توجه تشکیل استخوان می‌شود. سالمندی استخوان با کاهش فزایندۀ تراکم استخوان و تمایز آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان[1] (MSCs) ارتباط دارد (۴).

محرک‌های مکانیکی می‌توانند تاحدزیادی بر هموستاز اسکلتی و MSCها تأثیر بگذارند (۶، ۵). به‌نظر می‌رسد که بارگذاری مکانیکی نقشی مثبت در افزایش کل سلول‌های بنیادی مزانشیال مغز استخوان (۷)، افزایش استئوژنز و کاهش آدیپوژنز MSC استخوان (۸) و افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حساس به کشش به استئوبلاست‌ها (۹) ازطریق برخی از عوامل رونویسی مانند عامل رونویسی مرتبط با رانت[2] ۲ (Runx2) (۱۰) داشته باشد. درحالی‌که بیان ژن گیرندۀ فعال‌کنندۀ تکثیر پروکسی زوم گاما[3] (PPARγ)، به‌عنوان یک عامل مهم چربی‌زایی، MSCها را به بافت چربی متمایز می کند (۱۱).

شواهد جدید نشان داده‌اند که miRNAs در بازسازی مکانیسم استخوان ناشی از بارگذاری مکانیکی درگیر هستند (۱۲)؛ برای مثال، ناک‌اوت‌کردن miR17-92 در استئوبلاست‌ها، تولید کلاژن نوع I را در پاسخ به دو هفته بار مکانیکی کاهش داد (۱۳). همچنین، نشان داده شد که miR-103a یک miRNA حساس به بار مکانیکی است که ازطریق Runx2، تمایز استئوبلاست را تنظیم می‌کند (۱۴). در پژوهش دیگری نشان داده شد که miR-33-5p یک miRNA جدید حساس به بار مکانیکی است که می‌تواند تمایز استئوبلاست را افزایش دهد (۱۵).

به‌خوبی ثابت شده است که اثرهای استئوژنیک ناشی از ورزش، به نوع، شدت و بار اعمال‌شده بر استخوان‌ها بستگی دارد (۱۷، ۱۶)؛ بنابراین، فرض شده است که تمرین با شدت‌های مختلف به پاسخ‌های مختلف سلولی و درنتیجه، سازگاری‌های مختلف استخوانی منجر می‌شود و سازگاری استخوانی با تمایز استئوژنیک یا آدیپوژنیک MSCها همراه است (۱۸)؛ البته، پژوهش‌های علمی نشان داده‌اند که همۀ پروتکل‌های تمرینی به یک اندازه در بهبود تودۀ استخوانی کارایی ندارند؛ به‌عنوان‌مثال، روش‌هایی وجود دارند که می‌توانند به‌طور قابل‌توجهی بر کیفیت استخوانی تأثیر بگذارند و روش‌های

1. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
2. Runt-Related Transcription Factor 2
3. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

تمرینی‌ای هستند که تأثیر قابل‌توجهی بر بهبود آن ندارند (۱۹). براساس دانشکدهٔ طب ورزش آمریکا[1] (ACSM)، افراد برای حفظ و بهبود تودهٔ استخوان باید فعالیت‌های استقامت هوازی (تمرین‌های تحمل وزن) با شدت متوسط تا بالا انجام دهند (۲۰). ازطرف‌دیگر، تمرین‌های ورزشی مقاومتی به‌عنوان مؤثرترین نوع ورزش در سلامت استخوان شناخته شده‌اند. واضح است که در تمرین‌های مقاومتی بار یا مقاومت بر استخوان تحمیل می‌شود که سبب ایجاد محرک و ایجاد پاسخ استخوانی می‌شود (۲۱). همچنین، شدت فعالیت می‌تواند بر تراکم استخوان تأثیر داشته باشد؛ به‌گونه‌ای‌که برخی مطالعاتی که اثربخشی تمرین‌های بدنی را نشان داده‌اند، از شدت فعالیت زیادی بهره گرفته‌اند (۲۲)؛ زیرا، افزایش فشار بر استخوان ازطریق تحمل وزن بیشتر و همچنین، افزایش فشار بر استخوان ازطریق افزایش انقباض عضلانی، بر میزان تراکم استخوان مؤثرند (۲۳).

ازاین‌رو، در مطالعهٔ حاضر، از یک مدل حیوانی برای بررسی اثر شدت‌های مختلف تمرینی مقاومتی و استقامتی بر بیان mir-133a و دو فاکتور نسخه‌برداری استئوژنز و آدیپوژنز Runx2 و PPARγ در مغز استخوان موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار استفاده شده است. برای به‌دست‌آوردن بینش بیشتر در مکانیسم‌های مسئول بالقوهٔ تمایز MSCs به استئوژنیک و آدیپوژنیک در این مدل حیوانی، بارگذاری‌های مکانیکی مختلف بررسی شدند.

روش پژوهش

در پژوهش حاضر، ۴۰ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۴۳۸/۲۷ گرم در سن ۲۳ ماهگی، از مؤسسهٔ انستیتو پاستور ایران تهیه شدند؛ در شرایط دمایی ۳ ± ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد در شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری شدند و با غذای مخصوص موش صحرایی و آب تغذیه شدند. همچنین، همهٔ قوانین و نحوهٔ رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بی‌هوشی و کشتن حیوان) براساس انجمن ارزیابی و اعتباربخشی بین‌المللی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و با تأیید معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهرکرد انجام شدند. حیوان‌ها پس از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه، به‌صورت تصادفی و براساس وزن اولیهٔ موش‌ها، به پنج گروه با تعداد مساوی هشت سر شامل گروه کنترل[2] (C)، گروه تمرین استقامتی با شدت متوسط[3] (MICT)، گروه تمرین

1. American College of Sports Medicine
2. Control
3. Moderate-Intensity Continuous Training

استقامتی با شدت بالا[1] (HIIT)، گروه تمرین مقاومتی با شدت متوسط[2] (MIRT) و گروه تمرین مقاومتی با شدت بالا[3] (HIRT) تقسیم شدند. در گروه کنترل مداخلهٔ خاصی انجام نشد.

رت‌ها در هر دو گروه تمرین مقاومتی با شدت بالا و تمرین مقاومتی با شدت متوسط، برای آشناسازی با نحوهٔ اجرای پروتکل تمرینی، یک هفته بدون وزنه، تمرین بالارفتن از نردبان را انجام دادند. پس از آخرین جلسهٔ سازگاری، از حیوانات آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی[4] (MVCC) گرفته شد. سپس، MVCC به‌عنوان بالاترین بار حمل‌شدهٔ موفقیت‌آمیز تعریف شد (۲۴). با توجه به سازگاری حیوانات با تمرین، در انتهای هفتهٔ چهارم، دوباره از حیوانات آزمون MVCC گرفته شد و شدت تمرین حیوانات براساس آزمون جدید تعیین شد (۲۶، ۲۵).

پروتکل تمرین مقاومتی شامل بالارفتن از یک نردبان تمرینی مخصوص (طول ۱۱۰ سانتی‌متر، شیب ۸۰ درجه، ۲۶ پله و دو سانتی‌متر فضای بین هر پله) شامل دو نوع تمرین مقاومتی با شدت بالا و شدت متوسط، به‌مدت هشت هفته و پنج روز در هفته بود (جدول شمارهٔ یک) (۲۶، ۲۵).

جدول ۱- برنامهٔ تمرین مقاومتی

نوع تمرین	تعداد جلسه در هفته	شدت فعالیت	تعداد وهله‌های فعالیت	استراحت بین وهله‌های فعالیت	تعداد هفته
MIRT	پنج	۶۰ درصد MVCC	۱۴-۲۰ بار	دو دقیقه	هشت
HIRT	پنج	۸۰ درصد MVCC	۹-۱۰ بار	یک دقیقه	هشت

MIRT = تمرین مقاومتی با شدت متوسط، HIRT = تمرین مقاومتی با شدت بالا، MVCC = حداکثر ظرفیت حمل ارادی

برای تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی (MVCC)، وزنهٔ ۷۵ درصد وزن بدن حیوان به دم هر حیوان متصل شد و حیوان شروع به بالارفتن از نردبان با حمل این بار کرد. سپس، به‌ازای هر تکرار موفق، ۳۰ گرم به بار تمرینی تکرارشدهٔ قبلی اضافه شد. در بالای نردبان دو دقیقه استراحت بین هر صعود وجود داشت. این روش تازمانی‌که موش به صعود کل طول نردبان در سه تلاش متوالی موفق می‌شد، تکرار شد. اندازه‌گیری حداکثر ظرفیت حمل ارادی، در شروع هفتهٔ اول و هفتهٔ چهارم و در پایان هفتهٔ هشتم انجام شد (۲۴).

1. High Intensity Interval Training
2. Moderate-Intensity Resistance Training
3. High-Intensity Resistance Training
4. Maximum Voluntary Carrying Capacity

برای تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی، از آزمون فزایندهٔ استاندارد بیدفورد[1]و همکاران استفاده شده است که لیندرو[2] و همکاران (۲۷) آن را برای رت‌های نژاد ویستار استانداردسازی کردند. آزمون شامل ۱۰ مرحلهٔ سه‌دقیقه‌ای است. در مرحلهٔ اول، سرعت ۰/۳ کیلومتر در ساعت است و در مراحل بعدی ۰/۳ کیلومتر در ساعت، به سرعت نوار گردان اضافه می‌شود. لیندرو و همکاران پنج روش آزمون وامانده‌ساز را برای تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی معرفی کرده‌اند که دارای شیب متفاوت است؛ بنابراین، در این پژوهش از شیب صفر برای تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی استفاده شد. آزمون تا لحظه رسیدن موش صحرایی به واماندگی ادامه می‌یافت. سرعت نهایی موش صحرایی به عنوان سرعت بیشینه در زمان رسیدن به حداکثر اکسیژن مصرفی جهت محاسبه شدت‌های تمرینی موش های صحرایی استفاده گردید (۲۷).

با توجه به سرعت معادل با درصد حداکثر اکسیژن مصرفی مدنظر که به متر در دقیقه تبدیل شد، موش‌ها به‌مدت پنج جلسه در هفته، به‌مدت هشت هفته تمرین‌ها را انجام دادند که در انتهای هفتهٔ چهارم، از حیوانات آزمون مجدد گرفته شد و سرعت تمرین براساس آزمون جدید تعیین شد.

پروتکل تمرین با شدت بالا و شدت متوسط شامل سه قسمت بود: ۱- گرم کردن؛ ۲- تمرین شامل فعالیت‌های با شدت بالا و فعالیت با شدت متوسط؛ ۳- سردکردن (جدول شمارهٔ دو). تمرین با شدت بالا به‌گونه‌ای بودکه پس از گرم‌کردن موش‌های صحرایی ابتدا فعالیت با شدت بالا و پس از آن فعالیت با شدت پایین را انجام دادند. از انجام آخرین فعالیت با شدت بالا، موش‌های صحرایی به‌جای تمرین در سرعت معادل ۴۰ درصد سرعت بیشینه، به‌مدت پنج دقیقه با سرعت معادل ۵۰ درصد سرعت بیشینه سردکردن را انجام دادند. میزان تعداد فعالیت با شدت بالا در هفتهٔ اول، دو تکرار فعالیت، در هفتهٔ دوم، چهار تکرار فعالیت، در هفتهٔ سوم، شش تکرار فعالیت و از ابتدای هفتهٔ چهارم به بعد، هشت تکرار فعالیت با شدت بالا بود؛ ازاین‌رو، زمان کل تمرین شامل فعالیت با شدت بالا، فعالیت با شدت پایین به‌همراه گرم‌کردن و سردکردن در هفتهٔ اول ۱۶ دقیقه، در هفتهٔ دوم ۲۴ دقیقه، هفتهٔ سوم ۳۲ و از ابتدای هفتهٔ چهارم به بعد ۴۰ دقیقه بود. در گروه تمرین با شدت متوسط، موش‌ها ابتدا به‌مدت پنج دقیقه روی نوار گردان برای گرم‌کردن دویدند. سپس، با سرعت معادل ۶۰ درصد سرعت بیشینه در هفتهٔ اول، ۶۵ درصد سرعت بیشینه در هفتهٔ دوم و ۷۰ درصد سرعت بیشینه از هفتهٔ سوم به بعد تمرین با شدت متوسط را انجام دادند. مسافت دویدن موش‌ها در گروه تمرین با شدت متوسط به‌گونه ای بود که با مسافت تمرین گروه با شدت بالا برابر باشد (۲۸).

1. Bedford
2. Leandro

جدول ۲- پروتکل تمرین استقامتی دو گروه با شدت متوسط و شدت بالا براساس سرعت معادل اکسیژن مصرفی بیشینه

زمان	گرم‌کردن پنج دقیقه	تمرین با شدت متوسط (سرعت بیشینه)	گروه شدت بالا (هر تکرار دو دقیقه)	سردکردن پنج دقیقه
هفتهٔ اول ۱۶ دقیقه	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد	آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۳۴/۴ متر در دقیقه) شش دقیقه با ۶۰ درصد سرعت بیشینه	آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۳۳/۸ متر در دقیقه) دو تکرار با ۸۰ درصد و یک تکرار با ۴۰ درصد (سرعت بیشینه)	۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه
هفتهٔ دوم ۲۴ دقیقه	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه	۱۴ دقیقه با ۶۵ درصد سرعت بیشینه	چهار تکرار با ۹۰ درصد و سه تکرار با ۴۰ درصد سرعت بیشینه	۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه
هفتهٔ سوم ۳۲ دقیقه	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه	۲۲ دقیقه با ۷۰ درصد سرعت بیشینه	شش تکرار با ۱۰۰ درصد و پنج تکرار با ۴۰ درصد سرعت بیشینه	۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه
هفتهٔ چهارم ۴۰ دقیقه	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه	۳۰ دقیقه با ۷۰ درصد سرعت بیشینه	هشت تکرار با ۱۱۰ درصد و هفت تکرار با ۳۰ درصد سرعت بیشینه	۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه
هفتهٔ پنجم تا هفتهٔ هشتم ۴۰ دقیقه	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه	آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۴۰/۵ متر در دقیقه) ۳۰ دقیقه با ۷۰ درصد سرعت بیشینه	آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۳۹/۴ متر در دقیقه) هشت تکرار با ۱۱۰ درصد و هفت تکرار با ۳۰ درصد سرعت بیشینه	۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه

۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسهٔ تمرین، موش‌های صحرایی با تزریق درون‌صفاقی کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (سه تا پنج میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند (۲۹). روش جمع‌آوری مغز استخوان بدین‌صورت بود که ابتدا استخوان تیبیا جدا شد؛ تاحدامکان عضلات و بافت نرم اطراف پاک شدند؛ دو انتهای استخوان با استفاده از متهٔ دندان‌پزشکی قطع شدند؛ با آنژیوکت شمارهٔ ۱۸ و سرنگ پیستون‌دار مغز استخوان استخراج شد؛ در میکروتیوب‌های فاقد آنزیم RNase قرار گرفت و درنهایت، مغز استخوان‌های جمع‌آوری‌شده ابتدا در تانک نیتروژن و سپس، در دمای ۸۰- درجه فریز شد و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

برای استخراج RNA، از کیت استخراج ایرایزول RNA تولید شرکت زیست‌فن‌آوران رنای اصفهان (کد دسترسی RB1001) و طبق دستورالعمل زیر استفاده شد. ابتدا، میزان ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم از بافت مغز استخوان در هاون استریل، به‌خوبی همراه با یک میلی‌لیتر از بافر ایرایزول ساییده شد؛ به‌صورتی‌که محلول همگن به‌وجود آمد و به میکروتیوب دو میلی‌لیتر منتقل شد. محلول مخلوط در دمای محیط به‌مدت پنج دقیقه به‌طور ثابت قرار داده شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به مجموعه اضافه شد

و به‌صورت بالا و پایین به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه، به شدید تکان داده شد و دوباره به‌مدت پنج دقیقه در محیط قرار داده شد.

لوله¬ها به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰گرم سانتریفیوژ شدند. پس از انتقال فاز شفاف‌رویی به لوله جدید، به منظور رسوب دادن نوکلئیک اسیدها یک میلی‌لیتر اتانول مطلق سرد به آن افزوده و به مدت ده دقیقه در ۲۰° قرار داده شد. لوله‌ها به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شدند و پس از حذف فاز رویی، یک میل‌لیتر اتانول ۸۰ درصد، جهت شستشو، به لوله‌ها افزوده و سانتریفیوژ تکرار شد. پس از خارج کردن اتانول و خشک شدن محتوای داخل تیوب، رسوب RNA در ۳۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل حل شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و سنجش جذب نوری (۱/۸ ≤ ۲۶۰/۲۸۰ ≤ ۱/۵، ۲/۲ ≤ ۲۶۰/۲۳۰ ≤ ۱/۸) توسط دستگاه نانودراپ[1](ترموفیشرساینتیفیک، آمریکا) مشخص شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (RB) زیست‌فناوران رنا انجام گرفت. تمامی مواد از شرکت زیست‌فناوران رنا تهیه شدند. مراحل سنتز cDNA بدین‌شرح بود: ابتدا پنج میکرولیتر RNA، یک میکرولیتر d NTP (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر از الیگو T (100 میکرو مولار) و هشت میکرولیتر آب دوبارتقطیر استریل مخلوط شدند و به‌آرامی چرخانده شدند تا همهٔ مخلوط در انتهای تیوب جمع‌آوری شود. سپس، مخلوط به دستگاه ترموسایکلر مدل بایورد[2] منتقل گردید و ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. سپس، ویال حاوی مواد واکنش بلافاصله به‌مدت ۱۰ دقیقه روی یخ گذاشته شد و در ادامه، برای چند ثانیه سانتریفیوژ انجام شد و دوباره تیوب‌ها روی یخ قرار داده شدند. در این مرحله، به آن چهار میکرولیتر از بافر 5x RT اضافه شد و دوباره مخلوط حاصل به‌مدت دو دقیقه در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد (برای Oligo dT یا پرایمر اختصاصی) یا ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد (برای پرایمر تصادفی)، در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

در این مرحله، برای چند ثانیه دوباره سانتریفیوژ انجام شد. سپس، یک ماکرولیتر آنزیم ترانس کرپیتاز معکوس MMLV[3] (MMLVRT) اضافه شد و دوباره به‌مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد در دستگاه قرار داده شد. در مرحلهٔ آخر، مخلوط برای ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد و CDNA به‌دست آمد.

1. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8
2. Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA
3. Mouse Molony Leukemia Virus Reverse Transcriptase

برای ارزیابی بیان ژن از دستگاه بایورد[1] ساخت کشور آمریکا[2] استفاده شد. برای رونویسی معکوس ژن miR-133a، RUNX2 و PPARγ از یک میکروگرم RNA و کیت NORGEN کانادا با شمارهٔ تولید ۵۴۴۲۰ و براساس دستورالعمل کارخانهٔ مرتبط استفاده شد. تعیین سطح نسبی mRNA ژن miR-133a، RUNX2 و PPARγ به روش RT-PCR نیمه‌کمی و با استفاده از کیت NORGEN کانادا با شمارهٔ تولید ۲۸۳۲۳ و براساس دستورالعمل کارخانهٔ مرتبط استفاده شد. این روش به‌کمک پرایمرهای miR-133a، RUNX2 و PPARγ انجام شد (جدول شمارهٔ سه).

جدول ۳- توالی پرایمرهای miR-133a، Actin mus، RUNX2 و PPARγ

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	پایگاه اطلاعاتی مورداستفاده برای طراحی پرایمر
RUNX2	forward:CCGGGAATGATGAGAACTA reverse: GACCGTCCACTGTCACTTT	[NCBI
Actin mus	forward:ATGGTGGGTATGGGTCAGAAGG reverse :TGGCTGGGGTGTTGAAGGTC	NCBI
PPARγ	forward:CCCTGGCAAAGCATTTGTAT reverse: ACTGGCACCCTTGAAAAATG	NCBI
MIR-133A-3P	-5′- UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG-3′	miRBase

پروتکل ریل‌تایم پی.سی.آر[3] برای اندازه‌گیری فاکتورها برمبنای روش سایبرگرین شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه، ۴۰ سیکل مشتمل‌بر ۲۲ ثانیه (۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و ۲۲ ثانیه (۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و ۶۰ ثانیه (۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد) و درنهایت، مرحلهٔ ملتینگ در دمای ۹۵-۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد بود. همهٔ اندازه‌گیری‌ها دو بار روی هر نمونه انجام شدند. فرایند RT-PCR با استفاده از نرم‌افزارروتور جن کیو[4] انجام شد.

پس از اتمام فرایند و به‌دست‌آمدن چرخه‌های آستانه (Ct)، سنجش بیان متغیرهای موردنظر با استفاده از محاسبهٔ ریاضیاتی $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام شد (۳۰). ΔCt هر نمونه با استفاده از کنترل داخلی، Actin mus محاسبه شد (با تفریق Ctها از کنترل داخلی). سپس، ΔΔCt مرتبط برای هر نمونه، با کم‌کردن ΔCt آن نمونه از میانگین ΔCt گروه کنترل محاسبه شد. درنهایت، از رابطهٔ ریاضیاتی $2^{-\Delta\Delta ct}$ برای گزارش تغییرات بیان کمی متغیرها استفاده شد.

1. Bio-Rad
2. Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA
3. real time PCR
4. Rotor-Gene Q

برای بررسی برابری واریانس‌ها از آزمون لوین[1] و برای بررسی طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو- ویلک[2] استفاده شد. برای بررسی اثربخشی مداخلات از آزمون کروسکال والیس[3] استفاده شد و برای مقایسهٔ تغییرات وزن بین‌گروهی از آزمون آنوای تک‌راهه[4] استفاده گردید. تحلیل آماری با نرم‌افزار اس.پی.اس.اس.[5] نسخهٔ ۲۱ انجام شد. معناداربودن تفاوت‌های داده‌ها در سطح $P \leq 0.05$ محاسبه شد.

نتایج

جدول شمارهٔ چهار تغییرات وزن موش‌های صحرایی سالمند را در گروه‌های مختلف مطالعه نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان بیان mir-133a، Runx2 و PPARγ و تغییرات وزن در پنج گروه مقاومتی و استقامتی شدید، متوسط و گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت ($P > 0.05$) (جدول‌های شمارهٔ چهار، شمارهٔ پنج و شمارهٔ شش).

جدول ۴- میانگین تغییرات وزن (گرم)

گروه‌ها	وزن اولیه (گرم)		وزن هفتهٔ چهارم (گرم)		وزن نهایی (گرم)	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
MICT	۴۴۷	۲۴/۰۹	۴۳۸	۲۱/۶۲	۴۳۴/۸۸	۱۵/۶۷
HIIT	۴۳۲/۷۵	۴۸/۴۶	۴۲۲/۸۷	۴۹/۵۶	۴۱۶/۱۲	۴۲/۲۵
HIRT	۴۳۴/۱	۳۷/۸	۴۳۴/۳۷	۳۹/۲	۴۲۴/۶	۳۵
MIRT	۴۳۴/۲	۳۷/۹	۴۲۵	۳۸/۹	۴۲۶	۳۸/۷
C	۴۴۵/۵۰	۲۴/۰۷	۴۵۲	۳۰/۹۳	۴۴۱/۸۷	۲۷/۹۵
P values	۰/۸۳۲		۰/۵۲۸		۰/۵۷۸	

تمرین استقامتی با شدت متوسط (MICT)، تمرین استقامتی با شدت بالا (HIIT)، تمرین مقاومتی با شدت متوسط (MIRT)، تمرین مقاومتی با شدت بالا (HIRT)، گروه کنترل (C)

1. Levene
2. Shapiro- Wilk
3. Kruskal–Wallis
4. ANOVA One-Way
5. SPSS

جدول ۵- آمار توصیفی مقادیر mir-133a ، RUNX2 و Pparγ

گروه‌ها	MIR-133a		Runx2		Pparγ	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
MICT	۰/۸۴	۰/۴۴	۱/۱۱	۰/۸۲	۰/۸۲	۰/۴۱
HIIT	۱/۰۸	۰/۴۹	۱/۰۷	۰/۶۴	۱/۱۳	۰/۷۶
MIRT	۰/۸۲	۰/۱۶	۱/۰۹	۰/۴۰	۱/۰۳	۰/۴۹
HIRT	۰/۵۷	۰/۴۴	۰/۸۵	۰/۳۳	۰/۸۹	۰/۳۵
C	۱/۰۷	۰/۴۳	۱/۲۷	۱/۰۳	۱/۲۹	۰/۸۱

تمرین استقامتی با شدت متوسط (MICT)، تمرین استقامتی با شدت بالا (HIIT)، تمرین مقاومتی با شدت متوسط (MIRT)، تمرین مقاومتی با شدت بالا (HIRT)، گروه کنترل (C)

جدول ۶- آزمون کروسکال والیس مقادیر mir-133a، RUNX2 و Pparγ

متغیر	آماره	درجهٔ آزادی ۱	سطح معناداری
Mir-133a-3p	۶/۰۳۳	۴	۰/۱۹
Runx2	۰/۶۳۱	۴	۰/۹۶
Pparγ	۱/۲۳۸	۴	۰/۸۷

بحث و نتیجه‌گیری

درک اینکه چگونه مغز استخوان تمرین‌هایی با شدت‌های مختلف را احساس می‌کند و به آن‌ها واکنش می‌دهد، یکی از قسمت‌های مهم در پژوهش‌ها است. به‌طورکلی، مطالعات بسیار کمی وجود دارند که تأثیر تمرین‌های ورزشی بر بیان miRNAs را در مغز استخوان بررسی کرده‌اند؛ به‌ویژه اینکه تاکنون و به‌طور صریح، به تمرین‌های ورزشی با شدت‌ها و حالت‌های مختلف توجه نشده است. تغییرات در مدت زمان، شدت و تکرار تمرین‌های ورزشی تأثیرات متفاوتی بر استئوبلاست دارند. در مطالعهٔ حاضر، بار مکانیکی ازطریق هشت هفته تمرین استقامتی و مقاومتی با شدت‌های مختلف بر بیان mir-133a، Runx2 و PPARγ در موش‌های صحرایی نر برای تعمیم اثر بار مکانیکی بر استئوژنز بررسی شد. ازآنجایی‌که شدت تمرین ورزشی نقش مهمی در تمایز، توسعه و عملکرد استئوبلاست‌ها ایفا می‌کند (۳۱)، ما به بررسی شدت‌های مختلف تمرین استقامتی و مقاومتی پرداخته‌ایم.

داده‌های این پژوهش نشان دادند که بیان ژن mir-133a، Runx2 و PPARγ در پنج گروه پس از هشت هفته تمرین استقامتی و مقاومتی با شدت‌های مختلف، تفاوت معناداری نداشت. یافته‌های پژوهش ما مغایر با مشاهده‌های قبلی است که نشان می‌دهند mir-133a در عضلهٔ اسکلتی و گردش

خون (۳۵-۳۲)، PPARγ در بافت چربی و گردش خون (۳۷، ۳۶، ۳۴) و Runx2 در بافت و مغز استخوان (۳۹، ۳۸) به تمرین‌های ورزشی پاسخ می‌دهند. ازسوی‌دیگر، تحریک مکانیکی مناسب می‌تواند تکثیر سلول‌های استئوبلاست را تقویت کند (۴۰). علاوه‌براین، اخیراً گزارش شده است که تمرین‌های مقاومتی مولکول‌های ریز درون بافت استخوانی را در دوران سالمندی تغییر می‌دهند (۴۰)؛ اما علت مغایرت یافته‌های پژوهش حاضر با یافته‌های ذکرشده می‌تواند مرتبط با برخی از دلایل احتمالی مانند سن موش‌های صحرایی (۴۱)، زمان کوتاه مطالعه و نوع بار مکانیکی اعمال‌شده، توضیح داده شود (۴۲). ازطرفی، پاسخ‌پذیری جوانان به فعالیت بدنی بهتر از افراد مسن است (۴۳)؛ به‌عنوان‌مثال، ترنر[1] و همکاران (۴۱) نشان داده‌اند که پاسخ استئوژنیک موش‌های جوان نسبت به موش‌های مسن بالاتر است. هرچند زمانی‌که موش‌های مسن فعالیت می‌کنند، سلول‌های موش‌های مسن همانند موش‌های جوان دارای توانایی پاسخ‌گویی به بار مکانیکی بودند. به‌نظر می‌رسد که برخی از تغییرات مرتبط با سن در سیگنال‌های مکانیکی، هورمون‌ها، عوامل رشد و سیتوکین‌ها، موجب کاهش پاسخ اسکلت سالمندان به بار مکانیکی می‌شوند (۴۴). همچنین، توانایی بار مکانیکی برای فعال‌کردن مسیرهای سیگنالینگ در استخوان به‌وسیلهٔ نوع بار مکانیکی اعمال‌شده بر استخوان تعیین می‌شود (۱۹)؛ زیرا، قدرت عضلانی با تراکم استخوان و تأثیر آن بر محل اسکلت ارتباط دارد (۴۵). مدت زمان کوتاه پژوهش حاضر نیز یکی از علل تأثیرنداشتن این نوع فعالیت بدنی بر متابولیسم استخوان بود. ازآنجایی‌که بیشتر مطالعاتی که تأثیر معناداری بر بازسازی استخوان داشتند، بیش از ۱۵۰ تا ۲۰۰ روز طول کشیدند (۴۶)، پیشنهاد می‌شود که فعالیت بدنی طولانی‌مدت برای حفظ تودهٔ استخوان ضروری باشد (۴۷).

یکی از علت‌های دیگر اثربخش‌نبودن این پروتکل‌های تمرینی بر عوامل مرتبط با متابولیسم استخوان را می‌توان توسط قانون فروست[2] توضیح داد. فروست دو فرایند تحلیل و تشکیل استخوان را در پاسخ به بار مکانیکی پیشنهاد کرد (۴۷). همچنین، فروست در نظریهٔ خود پیشنهاد می‌کند که ساختار استخوانی ازطریق یک سیستم بازخوردی حفظ می‌شود؛ به‌طوری‌که افزایش فشار مکانیکی یا دینامیکی موجب تحریک استخوان می‌شود و رشد و تشکیل استخوانی را به‌همراه دارد. این نظریه به‌عنوان نظریهٔ وضعیت مکانیکی شناخته می‌شود. طبق این نظریه، فشار مکانیکی باید درحدی باشد که بتواند موجب سبقت تشکیل یا بازسازی استخوان بر فرایند بازجذب استخوانی شود. این فشار مکانیکی «حداقل آستانهٔ فشار مؤثر» نامیده می‌شود (۴۸)؛ ازاین‌رو، به‌احتمال‌زیاد در پژوهش‌هایی که تغییر در تراکم استخوانی دیده نمی‌شود مانند پژوهش حاضر، یا بدین‌دلیل است که شدت و بار تمرین در حداقل مقدار مؤثر، نبوده است که بتواند موجب بهبود تراکم استخوانی در استخوان تیبیا شود

1. Turner
2. Frost

(۴۸) و یا طبق این قانون، اگر استرس استخوان بیش از یک سطح معینی باشد، استئوکلاست‌ها بسیج می‌شوند و بازسازی تغییر می‌کند (۴۹). به‌طور خلاصه، معتقدیم که سطح آستانهٔ بار مکانیکی که بر متابولیسم استخوانی تأثیر می‌گذارد، با سن تغییر می‌کند؛ اما در این مطالعه، ما قادر به تعیین ارزش آستانه نبودیم.

نتایج نشان داد که تمرین‌های ورزشی استقامتی و مقاومتی در شدت‌های مختلف این پژوهش نتوانستند از تمایز استئوژنیک به آدیپوژنیک سلول‌های مغز استخوان موش‌های صحرایی سالمند جلوگیری کنند و متعاقب آن، ما هیچ تغییری در عوامل استئوژنیک و آدیپوژنیک، Runx2 و PPARγ توسط پروتکل تمرین استقامتی مشاهده نکردیم. نتایج این پژوهش تأیید کرد که بار مکانیکی اعمال‌شده در پژوهش حاضر نتوانست تمایز سلول‌های استئوبلاست را در مغز استخوان در موش‌های سالمند افزایش دهد.

ازطرفی، پژوهش حاضر نشان داد که تمرین‌های ورزشی با شدت متوسط، باعث بیان بالاتر Runx2 نسبت به PPARγ در مرحلهٔ ترجمه‌ای شدند. همچنین، در پژوهش‌های قبلی، کاهش در توده و خواص ساختاری استخوانی در پاسخ به ورزش شدید در حیوانات مشاهده شده است؛ زیرا، فعالیت شدیدتر از سطح آستانهٔ تحمل استخوان‌ها، باعث مهار رشد طبیعی و فعالیت بازسازی و کاهش خواص هندسی، مکانیکی و مواد سازنده در استخوان‌ها می‌شود (۵۰) یا ممکن است باعث آسیب‌های ریز استخوانی و درنهایت، درصورت اضافه و تجمع این آسیب‌های ریز به شکستگی استخوان‌ها منجر شود (۵۲، ۵۱). همان‌طورکه در پژوهش لو[1] و همکاران (۵۳) اشاره شد، قرارگرفتن رت‌ها درمعرض فشار کم مکانیکی می‌تواند باعث افزایش تمایز سلول‌های استرومائی مغز استخوان‌ها به استئوبلاست‌ها و کاهش تشکیل آدیپوسیت‌ها شود. چندین پژوهشگر نیز اظهار کردند که قرارگرفتن MSCs یا آدیپوسیت‌ها درمعرض استرین مکانیکی از تمایز آدیپوسیت‌ها جلوگیری می‌کند و باعث ایجاد استئوبلاست می‌شود (۵۶-۵۴). برعکس، بی‌باری روی اسکلت باعث افزایش آدیپوژنز و کاهش استئوژنز مغز استخوان، به‌ترتیب ازطریق مسیرهای PPARγ و Runx2 می‌شود (۵۷).

به‌طورکلی، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که یکی از دلایل احتمالی نتیجه‌گیری‌نکردن پژوهش حاضر می‌تواند سن شروع تمرین باشد؛ زیرا، در بیشتر پژوهش‌هایی که تمرین در آن‌ها مؤثر بوده است، موش‌ها در سن رشد و جوانی بوده‌اند. دلیل احتمالی دیگر می‌تواند مدت زمان تمرین باشد. ازآنجایی‌که در این پژوهش به مغز استخوان افراد سالمند نیاز بود، از موش صحرایی استفاده شد و به‌دلیل عمر کوتاه موش صحرایی، به اجرای دورهٔ تمرینی طولانی‌تری قادر نبودیم. شاید سالمندان به دوره‌های تمرین با زمان بیشتر پاسخ دهند که این موضوع به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد. به‌نظر می‌رسد که

1. Luu

پاسخ استخوان به تمرین ورزشی در دوران سالمندی، به دوره‌های تمرین طولانی‌تری در مقایسه با جوانان نیاز دارد. همچنین، در مطالعهٔ حاضر، فاکتورهای موردنظر فقط در مرحلهٔ پس‌آزمون اندازه-گیری شدند و مقدار اولیهٔ این فاکتورها در مرحلهٔ قبل و حین مداخله اطلاعاتی در دسترس نیست و این عامل نیز می‌تواند از دیگر عوامل دست‌نیافتن به نتایج معنادار باشد.

تعداد سالمندان در کشور ما و سایر کشورها روبه‌افزایش است و نتایج بیشتر پژوهش‌ها تأثیر مثبت انجام فعالیت بدنی بر عوامل فیزیولوژیک در این سنین را تأیید کرده‌اند؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های بعدی به بررسی تأثیر تمرین مقاومتی و استقامتی با مدت زمان طولانی‌تر و شدت‌های متفاوت و همچنین، تمرین‌های ترکیبی در افراد سالمند زن و مرد بپردازند.

پیام مقاله: بررسی تغییرات مولکولی و سلولی استخوان پس از انجام چنین تمرین‌هایی در مدت زمان بیشتر می‌تواند نتایج روشن‌تری را دربارهٔ تأثیرات مفید یا مضر این نوع تمرین‌ها در افراد سالمند سالم و غیرفعال نشان دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دکتر مهدی خزایی برای حمایت تکنیکی در تجزیه‌وتحلیل سلولی و مولکولی سپاس‌گزاری می‌کنند.

منابع

1. Qi Z, Liu W, Lu J. The mechanisms underlying the beneficial effects of exercise on bone remodeling: Roles of bone-derived cytokines and microRNAs. Prog Biophys Mol. 2016;122(2):131-9.
2. Rosenthall L, Falutz J, Guaraldi G. The relationships between total body, lumbar spine and femoral neck bone mineral density T-scores for diagnosis of low bone mass in HIV-infected patients. J Clin Nutr Metab. 2018;1:2-5.
3. Tuck SP, Datta HK. Osteoporosis in the aging male: Treatment options. Clin Interv Aging. 2007;2(4):521-36.
4. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts. Cell Death Differ. 2016;23(7):1128-39.
5. Delaine-Smith RM, Reilly GC. Mesenchymal stem cell responses to mechanical stimuli. Muscles Ligaments Tendons J. 2012;2(3):169-80.
6. Fahy N, Alini M, Stoddart MJ. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering. J Orthop Res. 2018;36(1):52-63.
7. Marędziak M, Śmieszek A, Chrząstek K, Basinska K, Marycz K. Physical activity increases the total number of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells, enhances their osteogenic potential, and inhibits their adipogenic properties. Stem Cills Int. 2015;2015: 1-15

8. Liu SY, Li Z, Xu SY, Xu L, Yang M, Ni GX. Intensity-dependent effect of treadmill running on differentiation of rat bone marrow stromal cells. Mol Med Rep. 2018;17(6):7746-56.
9. Hell RCR, Ocarino NM, Boeloni JN, Silva JF, Goes AM, Santos R L. Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Acta Physiol. 2012;205(2):292-301.
10. Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. J Cell Biochem. 2003;88(3):446-54.
11. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo-and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. Sci World J. 2012;2012: 1-14
12. Yuan Y, Zhang L, Tong X, Zhang M, Zhao Y, Guo J, et al. Mechanical stress regulates bone metabolism through micrornas. J Cell Physiol. 2017;232(6):1239-45.
13. Mohan S, Wergedal JE, Das S, Kesavan C. Conditional disruption of miR17-92 cluster in collagen type I-producing osteoblasts results in reduced periosteal bone formation and bone anabolic response to exercise. Phsiyol Genomics. 2014;47(2): 33-43.
14. Zuo B, Zhu JF, Li J, Wang CD, Zhao XY, Cai GQ, et al. MicroRNA-103a functions as a mechanosensitive microRNA to inhibit bone formation through targeting runx2. J Bone Miner Res. 2015;30(2):330-45.
15. Wang H, Sun Z, Wang Y, Hu Z, Zhou H, Zhang L, et al. MiR-33-5p, a novel mechano-sensitive microRNA promotes osteoblast differentiation by targeting Hmga2. Sci Rep-UK. 2016;6:23170-85.
16. Bailey C, Brooke-Wavell K. Exercise for optimising peak bone mass in women: Postgraduate Symposium. P Nutr Soc. 2008;67(1):9-18.
17. Kiuchi A, Shimegi S, Tanaka I, Izumo N, Fukuyama R, Nakamuta H, et al. Dose-response effects of exercise intensity on bone in ovariectomized rats. Int J Sport Health Sci. 2006;4:10-8.
18. Song F, Jiang D, Wang T, Wang Y, Lou Y, Zhang Y. Mechanical stress regulates osteogenesis and adipogenesis of rat mesenchymal stem cells through PI3K/Akt/GSK-3β/β-catenin signaling pathway. Biomed Res Int. 2017; 2017: 6027402-10
19. Gregov C, Šalaj S. The Effects of Different training modalities on bone mass: a Review. Kinesiol. Int J Fundam Appl Kinesiol. 2014;46(Supplement 1):10-29.
20. Kohrt WM, Bloomfield SA, Little KD, Nelson ME, Yingling VR. Physical activity and bone health. Med Sci Sports Exerc. 2004;36(11):1985-96.
21. Turner CH, Robling AG. Mechanisms by which exercise improves bone strength. J Bone Miner Metab. 2005;23(1):16-22.
22. Markou KB, Mylonas P, Theodoropoulou A, Kontogiannis A, Leglise M, Vagenakis AG, et al. The influence of intensive physical exercise on bone acquisition in adolescent elite female and male artistic gymnasts. J Endocrinol Metab. 2004;89:4383–7.
23. Maddalozzo GF, Snow CM. High intensity resistance training effects on bone in older men and women. Calcif Tissue Int. 2000;66:399–404.

24. de Cassia Marqueti R, Almeida JA, Guzzoni V, Boghi F, Renner A, Silva PE, et al. Resistance training minimizes the biomechanical effects of aging in three different rat tendons. J Biomech. 2017;53:29-35.
25. Krug AL, Macedo AG, Zago AS, Rush JWE, Santos CF, Amaral SL. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. Muscle Nerve. 2016;53(5):779-88.
26. Macedo AG, Krug ALO, Herrera NA, Zago AS, Rush JWE, Amaralab SL. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014;143:357-64.
27. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, et al. aprogram of moderate physical training for wistar rats based on maximal oxygen consumption. J Strength Cond Res. 2007;21(3):751-6.
28. Rezaei R, Norshahi M, Bigdeli M, Khodagholi F, Haghparast A. Effect of eight weeks continues and HIIT exercises on VEGF-A and VEGFR-2 levels in stratum, hippocampus and cortex of wistar rat brain. J PHYSIO sport PA. 2016;(16):1213-21. (In Persian).
29. Fani F, Abbassi Daloii A, Abdi A. The effect of 8 weeks of endurance training and L-NAME on Apelin in adipose tissue in elderly male's rats. J practi studi bio sport. 2016;4(8):77-88. (In Persian).
30. Kim SH, Kim GJ, Umemura T, Lee SG, Cho KJ. Aberrant expression of plasma microRNA-33a in an atherosclerosis-risk group. Mol Biol Rep. 2017;44(1):79-88.
31. Soves CP, Miller JD, Begun DL, Taichman RS, Hankenson KD, Goldsteina SA. Megakaryocytes are mechanically responsive and influence osteoblast proliferation and differentiation. Bone. 2014;66:111-20.
32. Nie Y, Sato Y, Wang C, Yue F, Kuang S, Gavin TP. impaired exercise tolerance, mitochondrial biogenesis, and muscle fiber maintenance in miR-133a–deficient mice. FASEB Journal. 2016;30(11):3745-58.
33. Gomes CPC, Oliveira-Jr GP, Madrid B, Almeida JA, Franco OL, Pereira RW. Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. Biomarkers. 2014;19(7):585-9.
34. Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Åkerström T, Nielsen AR, Pedersen BK, et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. J Physiol. 2010;588(20):4029-37.
35. Ogasawara R, Akimoto T, Umeno T, Sawada S, Hamaoka T, Fujita S. MicroRNA expression profiling in skeletal muscle reveals different regulatory patterns in high and low responders to resistance training. Physiol Genomics. 2016;48(4):320-4.
36. Li M, Bai Y, Jianfei C, Xiaodong X, Yuanyuan D, Jing Z. Effects of different exercise intensity on PPARγ and relative index in adolescent obesity rats. Wei Sheng Yan Jiu. 2014;43(5):732-7.
37. Thomas AW, Davies NA, Moir H, Watkeys L, Ruffino JS, Isa SA, et al. Exercise-associated generation of PPARγ ligands activates PPARγ signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. J Appl Physiol. 2011;112(5): 806-15.
38. Li Y, Ge C, Long JP, Begun DL, Rodriguez JA, Goldstein SA, et al., Biomechanical stimulation of osteoblast gene expression requires phosphorylation of the RUNX2 transcription factor. J Bone Miner Res. 2012;27(6):1263-74.

39. Ziros PG Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch. Int. J Biochem Cell Biol. 2008;40(9):1659-63.
40. Singulani MP, Stringhetta-Garcia CT, Santos LF, Morais SRL, Louzada MJQ, Oliveira SHP, et al. Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats. Sci Rep-UK. 2017;7(1):42878-9.
41. Turner CH, Takano Y, Owan I. Aging changes mechanical loading thresholds for bone formation in rats. J Bone Miner Res. 1995;10(10):1544-9.
42. Aido MIFd. The influence of age and mechanical loading on bone structure and material properties. TU Berlin: IBMS BoneKE; 2015: 84-8
43. Going SB, Farr JN. Exercise and bone macro-architecture: is childhood a window of opportunity for osteoporosis prevention? Int J Body Compos Res. 2010;8(1):1-9.
44. Razi H, Birkhold AI, Weinkamer R, Duda GN, Willie BM, Checa S. Aging leads to a dysregulation in mechanically driven bone formation and resorption. J Bone Miner Res. 2015;30(10):1864-73.
45. Heinonen A, Oja P, Kannus P, Sievanen H, Haapasalo H, Mänttäri A, et al. Bone mineral density in female athletes representing sports with different loading characteristics of the skeleton. Bone. 1995;17(3):197-203.
46. Wheater G, Elshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. J Transl Med. 2013;11(1):201-14.
47. Shimamura C, Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, Abe H, Toyama Y. Effect of decreased physical activity on bone mass in exercise-trained young rats. J Orthop Sci. 2002;7(3):358-63.
48. Sinaki M, Wahner HW, Bergstralh EJ, Hodgson SF, Offord KP, Squires RW, et al. Three-year controlled, randomized trial of the effect of dose-specified loading and strengthening exercises on bone mineral density of spine and femur in nonathletic, physically active women. Bone. 1996;19(3):233-44.
49. Turner C. Functional determinants of bone structure: beyond Wolff's law of bone transformation. Elsevier. 1992;13(6): 403-9.
50. Forwood MR, Burr DB. Physical activity and bone mass: Exercises in futility. Bone Miner. 1993;21(2):89-112.
51. Kotha SP, Hsieh YF, Strigel RM, Muller R, Silva MJ. Experimental and finite element analysis of the rat ulnar loading model-correlations between strain and bone formation following fatigue loading. J Biomech. 2004;37(4):541-8.
52. Uthgenannt BA, Silva MJ. Use of the rat forelimb compression model to create discrete levels of bone damage in vivo. J Biomech. 2007;40(2):317-24.
53. Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, Gilsanz V, Pessin JE, Judex S, et al. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. J Bone Miner Res. 2009;24(1):50-61.
54. David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor γ in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. Endocrinology. 2007;148(5):2553-62.

55. Sen B, Xie Z, Case N, Ma M, Rubin C, Rubin J. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. Endocrinology. 2008;149(12):6065-75.
56. Tanabe Y, Koga M, Saito M, Matsunaga Y, Nakayama K. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPARgamma2. J Cell Sci. 2004;117(16):3605–14
57. Marie P, Kaabeche K. PPAR gamma activity and control of bone mass in skeletal unloading. Ppar Res. 2006; 2006(1): 1-6.

ارجاع‌دهی

همتی فارسانی زهرا، بنی‌طالبی ابراهیم، فرامرزی محمد، بیغم صادق امین. تأثیر شدت‌های مختلف تمرین مقاومتی و استقامتی بر بیان microRNA-133a و دو فاکتور نسخه‌برداری استئوژنز و آدیپوژنز Runx2 و PPARγ در مغز استخوان موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار. فیزیولوژی ورزشی. تابستان ۱۳۹۸؛ ۱۱(۴۲): ۶۱ـ۷۸. شناسهٔ دیجیتال: 10.22089/spj.2017.3807.1514

Hemati Farsani Z, Banitalebi E, Faramarzi M, Bigham-Sadegh A. The Effect of Different Intensities Endurance and Resistance Training on Expression Mir-133a and Two Transcription Factors of Osteogenic and Adipogenic, Runx2 and PPARγ on Bone Marrow in Old Male Wistar Rats. Summer 2019; 11(42): 61-78. (In Persian). DOI: 10.22089/spj.2017.3807.1514

The Effect of Different Intensities Endurance and Resistance Training on Expression Mir-133a and Two Transcription Factors of Osteogenic and Adipogenic, Runx2 and Pparγ on Bone Marrow in Old Male Wistar Rats

Z. Hemati Farsani[1], E. Banitalebi[2], M. Faramarzi[3], A. Bigham-Sadegh[4]

1. Ph.D. Student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Literature and Humanies, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Associate Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Literature and Humanies, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*
3. Associate Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Literature and Humanies, Shahrekord University, Shahrekord
4. Professor of Clinical Sciences, Department of Veterinary Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 2018/07/21 **Accepted: 2018/11/11**

Abstract

Objective: aging is known as a low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue, resulting in increased risk of fracture. However, appropriate exercise for the prevention and treatment of osteoporosis has not been determined. The aim of this study was to determine the effects of compare effects of aerobic and resistance exercise training protocols with different intensities on microRNA-133a (mir-133a), Runx2 and Peroxisome proliferator-activated receptors-gamma (PPARγ) in bone marrow Wistar elderly rats. This experimental study was done on 40 Wistar male rats (23-month-old and with an average weight of 441.75 gram). They were randomly divided into five equal groups (n=8) include moderate (60% Maximum voluntary carrying capacity) or high (80% Maximum voluntary carrying capacity) intensity resistance training, moderate (60-110% Maximum speed) or high (80-110% Maximum speed) intensity endurance training and control. The two training groups completed 8 weeks of training program, 5 days a week according to resistance or endurance protocols. After completing training, expression of mir-133a, Runx2 and PPARγ on bone marrow were measured RT-PCR. The statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test with significance level of $P < 0.05$. There was no significance in expression of mir-133a (P=0.197), Runx2 (P=0.960) and PPARγ (P=0.872) in five groups. However, the Runx2 expression level ratio to PPARγ was higher in the moderate training group. Also, the highest decrease of mir-133a was observed in the resistance training group. Conclusion: Investigating cellular changes in bone after such exercises requires longer periods of exercise, or other measurements, especially at proteomics level, that should be investigated in future research.

Keywords: Bone Metabolism, Mir-133a, Runx2, Endurance and Resistance Training, PPARγ

* Corresponding Author Email: banitalebi.e@gmail.com