



تأثیر هشت هفته تمرین مقاومتی و استقامتی شدید و متوسط بر بیان mir-133a، Runx2 و PPAR γ در مغز استخوان ران موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار

زهره همتی فارسانی^{۱*}، ابراهیم بنی طالبی^۱، محمد فرامرزی^۱، امین بیغم صادق^۲

۱- گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده	پژوهشی اصیل
مقدمه بهترین راه پیشگیری از بروز پوکی استخوان در سالمندی جلوگیری از کاهش تراکم استخوانی و یا تلاش در جهت حفظ آن در سنین جوانی است. هدف از مطالعه حاضر، تأثیر شدت‌های مختلف تمرین استقامتی و مقاومتی بر بیان microRNA-133a (mir-133a) و Runx2 و PPARγ در مغز استخوان ران موش‌های صحرایی نر سالمند بود. مواد و روش‌ها این مطالعه تجربی، روی ۴۰ سر موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار انجام شد. موش‌های صحرایی در ۵ گروه مساوی ۸ تایی شامل تمرینات مقاومتی و استقامتی با شدت متوسط و شدید و گروه کنترل قرار گرفتند. گروه‌های تمرینی، ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته برنامه تمرینی را طبق پروتکل مقاومتی یا استقامتی اجرا کردند. بر روی موش‌های صحرایی گروه کنترل، هیچگونه مداخله‌ای صورت نگرفت. بعد از دوره تمرین بیان mir-133a، Runx2 و PPARγ به روش RT-PCR اندازه‌گیری شدند. تجزیه تحلیل آماری با استفاده از آزمون کروسکال والیس با سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد. یافته‌ها این پژوهش نشان داد بیان mir-133a ($P = 0.001$)، Runx2 ($P = 0.000$) و PPARγ ($P = 0.000$) در گروه تمرین با شدت بالا و شدت متوسط و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. نتیجه‌گیری به نظر می‌رسد تغییرات سلولی متابولیسم استخوان پس از انجام چنین تمریناتی نیاز به دوره‌های طولانی‌تر تمرین ورزشی دارد که باید در تحقیقات آینده مورد بررسی قرار بگیرد. کلیدواژه‌ها mir-133a، RUNX2، PPARγ، استخوان ران، تمرین استقامتی و مقاومتی، متابولیسم استخوان	تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۳ *نویسنده مسئول: زهره همتی فارسانی، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، گروه علوم ورزشی شماره تلفن: پست الکترونیک: Hematyn.sport87@yahoo.com



مقدمه

کاهش تشکیل استخوان، افزایش جذب استخوان، یا هر دو از عوامل کاهش پیشرونده توده استخوانی و افزایش حساسیت به شکستگی در سالمندی است (۱). استئوبلاست‌ها و آدیپوسیت‌ها از پیش‌ساز مشترک یعنی استروما مزانشیمی مغز استخوان / سلول‌های بنیادی^۱ ایجاد می‌شوند. سالمندی با کاهش تعداد استئوبلاست‌های استخوانی و افزایش تعداد آدیپوسیت‌های مغز استخوان همراه است (۲).

دو فاکتور رونویسی مهم یعنی عامل رونویسی مرتبط با رانت^۲ و گیرنده پراکسی‌زوم پرولیفرا تور اکتیویاتور گاما^۳ به ترتیب منجر به تمایز MSC‌ها به استئوبلاست‌ها یا آدیپوسیت‌ها می‌شوند (۳). PPAR γ از خانواده پروتئین‌هایی است که جریان انرژی را در سلول‌های استخوانی تنظیم می‌کند (۴) و برای حفظ بیان و عملکرد آدیپوسیت‌ها ضروری است (۲). RUNX2 یک فاکتور رونویسی است که با بیان استئوبلاست ارتباط دارد (۵). RUNX2 به عنوان تنظیم کننده اصلی تمایز و بیان استئوبلاست‌ها شناخته شده است (۵). در واقع، فعالیت استئوژنیک سلول‌های استروما مغز استخوان، باعث بیان بیش از حد Runx2 می‌شود (۵). Runx2 هم در سطح ترجمه‌ای و هم در سطح پس از ترجمه ای تنظیم می‌شود (۵، ۶).

از عواملی که Runx2 را در سطح ترجمه‌ای و پس از ترجمه-ای کنترل می‌کند می‌توان به ترتیب به PPAR γ و microRNA اشاره کرد (۷). MicroRNA‌ها (miRNAs)، ریبونوکلیک اسیدهای غیرکدکننده هستند که از نظر تکاملی محافظت شده هستند و دارای طولی برابر ۲۱-۲۵ نوکلئوتید هستند. miRNA بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها، کنترل می‌کند

کنند (۸). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که miRNAs تمایز استئوبلاست را تنظیم می‌کنند (۹). MiR-133a، یکی از اعضای خانواده miRNA‌ها است که نقش تنظیمی در تشکیل استخوان دارد. آزمایشات بروی حیوانات نشان داده است که miR-133a می‌تواند مانع بیان RUNX2 شود و در نتیجه بیان و تمایز استئوبلاست‌ها را مهار کند (۱۰). تحریک مکانیکی استخوان قادر به ایجاد تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حساس به بار مکانیکی به استئوبلاست‌ها است (۱۱ و ۱۲). همچنین تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که بار مکانیکی یک ابزار قوی در جهت پیشگیری از پوکی استخوان است (۱۳ و ۱۴) و مکانیسم عمل آن به نظر می‌رسد با تعدیل بیان miRNAs مرتبط است (۱۵).

با وجود این‌که در برنامه‌هایی که شامل قدرت و استقامت بدن بوده است، اثرات مثبت این برنامه‌ها بر بافت استخوان دیده شده است (۱۶) اما تمرینات با روش‌ها و شدت‌های مختلف هوازی و مقاومتی نتایج متفاوتی در فرایند سازگاری نشان دادند زیرا هر روش تمرینی منجر به فعالیت مسیرهای سیگنالینگ متفاوت و خاص می‌شود و همچنین زیر مجموعه‌ای از ژن‌ها که بوسیله miRNA تنظیم می‌شوند، ممکن است در سازگاری با فعالیت بدنی موثر باشند (۱۷). در واقع، بر اساس انواع سازگاری‌های مطلوبی که تمرین هوازی و تمرین مقاومتی به تنهایی می‌توانند در افراد مسن ایجاد کنند، تجویز هر دو نوع فعالیت معمولاً به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است (۱۸).

مثلاً تحقیق چین^۴ و همکارانش نشان دادند که تمرینات روی تردمیل می‌تواند از کاهش تشکیل استخوان از طریق مهار فاکتور تمایز آدیپوسیت PPAR γ جلوگیری کند ولی این نوع تمرین روی Runx2 تاثیر نداشت (۱۹). همچنین

^۱marrow mesenchymal stroma/stem cells: mMSC^۲Runt-related transcription factor 2: RUNX2^۳peroxisome proliferator-activated receptor γ : PPAR γ ^۴Chen



سینگلانی^۱ و همکارانش اثرات تمرینات قدرتی بر خواص مکانیکی استخوان و تمایز استئوژنیک سلول‌های استرومایی مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) در موش‌های صحرایی مسن را بررسی کردند، رت‌های مسن تمرین کرده مقادیر بیشتری از تراکم مواد معدنی را نشان دادند و تمرینات قدرتی موجب افزایش بیان ژن Runx2 و کاهش بیان ژن PPAR γ شد (۲۰). با این وجود، برای انتخاب بهترین برنامه تمرینی قدرتی که بتواند پاسخ استخوانی مناسب را ایجاد کند چندین عامل مورد بحث است از جمله می‌توان به شدت و دوره لازم تمرین اشاره کرد (۲۱) و با در نظر گرفتن نقش شناخته شده‌ای که مسیر Runx2 در استئوژنز دارد و برای درک بهتر تغییرات مربوط به سن در تمایز استئوژنیک ناشی از تحریک مکانیکی ضروری است که کشف شود چگونه فشار مکانیکی قادر به کنترل پوکی استخوان است.

با وجود اثبات اثر مثبت تمرین بدنی بر استخوان در این مطالعات و مطالعات دیگر، ویژگی‌های تمرین از قبیل: شدت، مدت، تکرار و نوع تمرین که به‌طور مؤثرتری توده استخوان را افزایش و یا تخریب آن را کاهش دهد، بطور قطع تعیین نشده است (۲۲). در این راستا پژوهش حاضر در تلاش است، با بکارگیری ۴ نوع تمرین بدنی با ماهیت و شدت متفاوت، اثرات تمرین بر بهبود بافت استئوپروتیک بسنجید و پاسخ استئوژنیک استخوان در برابر بار مکانیکی متفاوت تمرین‌ها، مقایسه کند.

کاهش تشکیل استخوان، افزایش جذب استخوان، یا هر دو از عوامل کاهش پیشرونده توده استخوانی و افزایش حساسیت به شکستگی در سالمندی است (۱). استئوبلاست‌ها و آدیپوسیت‌ها از پیش‌ساز مشترک یعنی mMSC ایجاد می‌شوند. سالمندی با کاهش تعداد استئوبلاست‌های استخوانی و افزایش تعداد آدیپوسیت‌های مغز استخوان همراه است

(۲). دو فاکتور رونویسی مهم یعنی عامل رونویسی مرتبط با RUNX2 و PPAR γ به ترتیب منجر به تمایز MSCها به استئوبلاست‌ها یا آدیپوسیت‌ها می‌شوند (۳). PPAR γ از خانواده پروتئین‌هایی است که جریان انرژی را در سلول‌های استخوانی تنظیم می‌کند (۴) و برای حفظ بیان و عملکرد آدیپوسیت‌ها ضروری است (۲).

RUNX2 یک فاکتور رونویسی است که با بیان استئوبلاست ارتباط دارد (۵). RUNX2 به عنوان تنظیم کننده اصلی تمایز و بیان استئوبلاست‌ها شناخته شده است (۵). در واقع، فعالیت استئوژنیک سلول‌های استروما مغز استخوان، باعث بیان بیش از حد Runx2 می‌شود (۵). Runx2 هم در سطح ترجمه‌ای و هم در سطح پس از ترجمه‌ای تنظیم می‌شود (۵و۶). از عواملی که Runx2 را در سطح ترجمه‌ای و پس از ترجمه‌ای کنترل می‌کند می‌توان به ترتیب به PPAR γ و microRNA اشاره کرد (۷). MicroRNAها (miRNAs)، ریبونوکلیک اسیدهای غیرکدکننده هستند که از نظر تکاملی محافظت شده هستند و دارای طولی برابر ۲۱-۲۵ نوکلئوتید هستند. miRNAها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها، کنترل می‌کنند (۸). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که miRNAs تمایز استئوبلاست را تنظیم می‌کنند (۹). MiR-133a، یکی از اعضای خانواده miRNAها است که نقش تنظیمی در تشکیل استخوان دارد. آزمایشات روی حیوانات نشان داده است که miR-133a می‌تواند مانع بیان RUNX2 شود و در نتیجه بیان و تمایز استئوبلاست‌ها را مهار کند (۱۰). تحریک مکانیکی استخوان قادر به ایجاد تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حساس به بار مکانیکی به استئوبلاست‌ها است (۱۱و۱۲). همچنین تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که بار مکانیکی یک ابزار قوی در جهت پیشگیری از پوکی

^۱ Singulani



استخوان است (۱۳ و ۱۴) و مکانیسم عمل آن به نظر می‌رسد با تعدیل بیان miRNAs مرتبط است (۱۵).

با وجود این‌که در برنامه‌هایی که شامل قدرت و استقامت بدن بوده است، اثرات مثبت این برنامه‌ها بر بافت استخوان دیده شده است (۱۶) اما تمرینات با روش‌ها و شدت‌های مختلف هوازی و مقاومتی نتایج متفاوتی در فرایند سازگاری نشان دادند زیرا هر روش تمرینی منجر به فعالیت مسیرهای سیگنالینگ متفاوت و خاص می‌شود و همچنین زیر مجموعه‌ای از ژن‌ها که بوسیله miRNA تنظیم می‌شوند، ممکن است در سازگاری با فعالیت بدنی موثر باشند (۱۷).

در واقع، بر اساس انواع سازگاری‌های مطلوبی که تمرین هوازی و تمرین مقاومتی به تنهایی می‌توانند در افراد مسن ایجاد کنند، تجویز هر دو نوع فعالیت معمولاً به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است (۱۸). مثلاً تحقیق چین و همکارانش نشان دادند که تمرینات روی تردمیل می‌تواند از کاهش تشکیل استخوان از طریق مهار فاکتور تمایز آدیپوسیت PPAR γ جلوگیری کند ولی این نوع تمرین روی Runx2 تاثیر نداشت (۱۹). همچنین سینگلانی و همکارانش اثرات تمرینات قدرتی بر خواص مکانیکی استخوان و تمایز استئوژنیک سلول‌های استرومایی مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) در موش‌های صحرایی مسن را بررسی کردند، رت‌های مسن تمرین کرده مقادیر بیشتری از تراکم مواد معدنی را نشان دادند و تمرینات قدرتی موجب افزایش بیان ژن Runx2 و کاهش بیان ژن PPAR γ شد (۲۰). با این وجود، برای انتخاب بهترین برنامه تمرینی قدرتی که بتواند پاسخ استخوانی مناسب را ایجاد کند چندین عامل مورد بحث است از جمله می‌توان به شدت و دوره لازم تمرین اشاره کرد (۲۱) و با در نظر گرفتن نقش شناخته شده‌ای که مسیر Runx2 در استئوژنز دارد و برای درک بهتر تغییرات مربوط به سن در تمایز استئوژنیک ناشی

از تحریک مکانیکی ضروری است که کشف شود چگونه فشار مکانیکی قادر به کنترل پوکی استخوان است.

با وجود اثبات اثر مثبت تمرین بدنی بر استخوان در این مطالعات و مطالعات دیگر، ویژگی‌های تمرین از قبیل: شدت، مدت، تکرار و نوع تمرین که به‌طور مؤثرتری توده استخوان را افزایش و یا تخریب آن را کاهش دهد، به‌طور قطع تعیین نشده است (۲۲). در این راستا پژوهش حاضر در تلاش است، با بکارگیری ۴ نوع تمرین بدنی با ماهیت و شدت متفاوت، اثرات تمرین بر بهبود بافت استئوپروتیک بسنجید و پاسخ استئوژنیک استخوان در برابر بار مکانیکی متفاوت تمرین‌ها، مقایسه کند.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر تعداد ۴۰ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۴۳۷/۲ گرم در سن ۲۳ هفته‌گی از موسسه انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری و با غذای مخصوص موش صحرایی و آب تغذیه شدند. همچنین، کلیه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان) بر اساس انجمن ارزیابی و اعتباربخشی بین‌المللی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و با تایید کمیته اخلاق معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه انجام گردید. حیوان‌ها پس از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه به روش تصادفی به پنج گروه با تعداد مساوی ۸ سر شامل گروه کنترل و تجربی تمرین تداومی با شدت متوسط^۲ و تمرین تناوبی با شدت بالا^۳ و تمرین مقاومتی با شدت متوسط^۴ و تمرین

^۱Control: C

^۲Moderate-Intensity Continuous Training: MICT

^۳High Intensity Interval Training: HIIT

^۴Moderate-Intensity Resistance Training: MIRT



مقاومتی با شدت بالا^۱ تقسیم شدند. گروه کنترل تحت مداخله خاصی قرار نگرفت.

پروتکل تمرین مقاومتی

شامل بالا رفتن از یک نردبان تمرینی مخصوص (طول ۱۱۰ سانتی متر، شیب ۸۰ درجه، ۲۶ پله و ۲ سانتی متر فضای بین هر پله) شامل دو نوع تمرین مقاومتی با شدت بالا و شدت متوسط به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته بود. در تمرین مقاومتی با شدت بالا، با ۸۰ درصد از MVCC، ۹-۱۰ تکرار در هر جلسه و شدت متوسط، با ۶۰ درصد از MVCC و ۱۴-۲۰ بالا رفتن از نردبان انجام شد (۲۴ و ۲۳).

آزمون جهت تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی (MVCC)

جهت تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی، وزنه ۷۵ درصد وزن بدن حیوان به دم آن‌ها متصل و حیوان شروع به بالا رفتن از نردبان با حمل این بار کرد، سپس به ازای هر تکرار موفق ۳۰ گرم به بار تمرینی تکرار شده قبلی اضافه شد. در بالای نردبان ۲ دقیقه استراحت بین هر صعود وجود داشت. این روش تا زمانی که موش موفق به صعود کل طول نردبان در ۳ تلاش متوالی نشد، تکرار شد. اندازه‌گیری حداکثر ظرفیت حمل ارادی در شروع هفته اول و چهارم و در پایان هفته هشتم انجام شد (۲۵).

پروتکل تمرین استقامتی

شامل دو نوع تمرین تناوبی با شدت بالا و تمرین تداومی با شدت متوسط به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته بود. هر دو پروتکل تمرین استقامتی موش‌ها ابتدا به مدت ۵ دقیقه با شدت ۴۰-۵۰ درصد سرعت بیشینه بر روی نوارگردان برای گرم کردن دویدند و در پایان به مدت ۵ دقیقه سرد کردن را در شدت ۴۰-۵۰ درصد سرعت بیشینه انجام دادند. تمرین

تناوبی با شدت بالا شامل ۳ قسمت گرم کردن، تمرین (فعالیت‌های با شدت بالا و فعالیت با شدت پایین) و سرد کردن است. فعالیت با شدت بالا شامل ۲ دقیقه با شدت ۸۰ درصد بیشینه در هفته اول؛ ۹۰ درصد بیشینه در هفته دوم، ۱۰۰ درصد بیشینه در هفته سوم و ۱۱۰ درصد سرعت بیشینه از ابتدای هفته چهارم، تا پایان تمرین است، فعالیت با شدت پایین شامل ۲ دقیقه با شدت ۴۰ درصد بیشینه از هفته اول تا پایان سوم و ۳۰ درصد سرعت بیشینه از ابتدای هفته چهارم به بعد است.

تمرین تناوبی به گونه‌ای است که پس از گرم کردن رت‌ها ابتدا فعالیت با شدت بالا و پس از آن فعالیت با شدت پایین را انجام دهند، پس از انجام آخرین فعالیت با شدت بالا رت‌ها به جای تمرین در شدت ۴۰ درصد بیشینه به مدت پنج دقیقه با شدت ۵۰ درصد سرعت بیشینه سرد کردن را انجام می‌دهند، تعداد فعالیت با شدت بالا با توجه به هفته تمرینی حیوانات تعیین گردیده است. به صورتی که در هفته اول دو تکرار فعالیت؛ هفته دوم چهار تکرار فعالیت؛ هفته سوم شش تکرار فعالیت و از ابتدای هفته چهارم به بعد شامل هشت تکرار فعالیت با شدت بالا خواهد بود. از این‌رو زمان کل تمرین شامل فعالیت با شدت بالا، فعالیت با شدت پایین به همراه گرم کردن و سرد کردن در هفته اول ۱۶ دقیقه، در هفته دوم ۲۴ دقیقه، هفته سوم ۳۲ و از ابتدای هفته چهارم به بعد ۴۰ دقیقه است (۲۴).

پروتکل تمرین تداومی با شدت متوسط با شدت ۶۰ درصد سرعت بیشینه در هفته اول؛ ۶۵ درصد سرعت بیشینه در هفته دوم؛ ۷۰ درصد سرعت بیشینه از هفته سوم به بعد تمرین تداومی را انجام خواهند دادند. مسافت دویدن موش‌ها در گروه تمرین تداومی به گونه‌ای است که با مسافت تمرین گروه تناوبی برابر باشد. از این‌رو زمان تمرین در شدت ۷۰ درصد سرعت بیشینه با توجه به مقدار جابجایی

^۱ High-Intensity Resistance Training: HIRT



روش اندازه‌گیری متغیرها

استخراج RNA

یه منظور استخراج RNA از کیت استخراج ایرایزول RNA تولید شده تولید شرکت زیست فن آوران رنا (کد دسترسی RB1001) و طبق دستورالعمل زیر استفاده شد.

ابتدا میزان ۵۰-۱۰۰ میلی گرم از بافت مغز استخوان ران را در هاون استریل به خوبی همراه با یک میلی لیتر از بافر ایرایزول، سائیده به صورتی که محلول همگن به وجود آمد و به میکروتیوپ دو میلی لیتر منتقل گردید. محلول میکس در دمای محیط به مدت ۵ دقیقه ثابت قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مجموعه اضافه گردید و به صورت بالا و پایین به شدت ۱۰-۱۵ ثانیه تکان داده و دوباره به مدت ۵ دقیقه در محیط قرار داده شد. تیوپ حاوی مخلوط در سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام این مرحله دو فاز به صورت مشخص قابل مشاهده بود، فاز شفاف‌رویی که حاوی RNA است را جدا، به داخل تیوپ دیگر منتقل، ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد سرد به آن اضافه و سپس به مدت ۸ دقیقه در داخل فریزر ۲۰- قرار داده شد. در پایان تیوپ را از فریزر خارج و شبیه مرحله‌ی قبل سانتریفیوژ گردید، مایع داخل تیوپ پس از سانتریفیوژ دور ریخته شد. در این مرحله گاهی ولی نه معمولاً لکه‌های بی رنگ و یا مایل به سفید در بدنه و کف تیوپ مشاهده گردید. سانتریفیوژ با اضافه کردن اتانول ۸۰ درصد جهت شستشو تکرار شد و پس از خارج کردن اتانول و خشک کردن محتوای داخل تیوپ (در این مرحله روش air-dry مورد استفاده قرار گرفت) ۲۰-۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بسته به میزان رسوب به آن اضافه و با پیپت RNA داخل تیوپ حل شد.

سپس ۵ میکرولیتر از آن به منظور تایید کیفیت بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفوروز شد تا پس از تابید از آن در

پروتکل تمرین تناوبی (بدون محاسبه جابجایی در مرحله گرم کردن و سرد کردن) محاسبه گردیده است. (۲۴).

آزمون جهت تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی

جهت تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی از آزمون فزاینده استاندارد بیدفورد و همکاران استفاده شده است که به وسیله کارول گوینز لیندرو و همکاران جهت رت‌های نژاد ویستار استانداردسازی گردید (۲۶). آزمون شامل ۱۰ مرحله سه دقیقه‌ای است. سرعت در مرحله اول ۰/۳ کیلومتر بر ساعت و در مراحل بعدی ۰/۳ کیلومتر بر ساعت به سرعت نوارگردان اضافه می‌شود. با توجه به اینکه پنج روش آزمون وامانده‌ساز توسط رینولدو و همکاران جهت تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی معرفی شده که دارای شیب متفاوت است. در این تحقیق از شیب صفر برای تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی استفاده گردید و سرعت بدست در آخرین مرحله که حیوان قادر به دویدن نبود به عنوان حداکثر سرعت دویدن حیوان استفاده گردید (۲۶).

استخراج بافت

۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی با تزریق درون صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵-۳ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند (۲۷). روش جمع‌آوری مغز استخوان بدین صورت بود که ابتدا استخوان ران جدا گردید و تا حد امکان عضلات و بافت نرم اطراف پاک شد و دو انتهای استخوان با استفاده از مته دندان‌پزشکی قطع گردید و با آنژیوکت شماره‌ی ۱۶ و سرنگ پیستون‌دار مغز استخوان استخراج و در میکروتیوپ‌های فاقد آنزیم RNase قرار گرفتند و نهایت مغز استخوان‌های جمع‌آوری شده ابتدا در تانک نیتروژن و سپس در دمای ۸۰- درجه فریز شده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

^۱Leandro



در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد.

سنتز c DNA

مطابق جدول (۱)، سنتز c DNA با استفاده از کیت سنتز c DNA (RB) زیست فناوری رنا انجام گرفت. تمامی مواد از شرکت زیست فناوری رنا تهیه گردید.

سنتز cDNA استفاده گردد. جهت DNAزادایی از محصول RNA استخراجی به کمک DNaseI پس از تایید کیفیت RNA بروی ژل ۱ درصد آگاروز به میزان ۰/۵ میکرولیتر DNase I به غلظت ۲ واحد بر میکرولیتر به تیوپ حاوی RNA به غلظت ۵۰۰ نانوگرم تا ۵ میکروگرم اضافه و سپس

جدول ۱- سنتز c DNA

ماده	مقدار (μl)
RNA	۵
d NTP (۱۰ Mm)	۱
الیگو (۱۰۰ μM)	۱
آب دوبار تقطیر استریل	۸
۱۰ دقیقه دمای ۶۵ درجه	
۱۰ دقیقه روی یخ	
بافر (۵ X)	۴
آنزیم رونوشت بردار معکوس (۴۰۰ u/μl)	۱
حجم کل	۲۰

جدول ۲- توالی پرایمرهای miR-133a، Actin mus، RUNX2 و PPAR γ

نام پرایمر	پایگاه اطلاعاتی مورد استفاده جهت طراحی پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
RUNX2	NCBI	forward: CCGGGAATGATGAGAACTA reverse: GACCGTCCACTGTCACCTT
Actin mus	NCBI	forward: ATGGGTGGGTATGGGTCAGAAGG reverse: TGGCTGGGGTGTGAAGGTC
PPAR γ	NCBI	forward: CCCTGGCAAAGCATTGTAT reverse: ACTGGCACCTTGAAAAATG
MIR-133A-3P	miRBase	5'- UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG-3'

تجزیه و تحلیل آماری

SPSS v.21 انجام شد. معنی دار بودن تفاوت‌های داده‌ها در

سطح $P \leq 0/05$ محاسبه گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان داد میزان بیان mir-133a، Runx2 و PPAR γ در ۵ گروه مقاومتی و استقامتی شدید، متوسط و گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت (جدول ۳).

به منظور بررسی برابری واریانس‌ها از آزمون لوین و برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک استفاده گردید. برای بررسی اثربخشی مداخلات از آزمون کروسکال والیس استفاده گردید. تحلیل آماری با نرم‌افزار

جدول ۳- آمار توصیفی مقادیر PPAR γ و RUNX2, mir-133a در مغز استخوان ران

گروه‌ها	MIR-133a میانگین	انحراف معیار	RUNX2 میانگین	انحراف معیار	PPAR γ میانگین	انحراف معیار
MICT	۱/۴۱	۱/۲۴	۱/۲۴	۰/۶۵	۱/۱۸	۰/۵۵
HIIT	۰/۹۷	۰/۳۴	۱/۲۱	۰/۸۲	۱/۰۲	۰/۸۱
MIRT	۱/۲۲	۰/۵۷	۱/۱۳	۰/۶۳	۱/۰۱	۰/۷۱
HIRT	۱/۱۱	۰/۷۴	۱/۱۲	۰/۳۲۹	۰/۷۱	۰/۳۸
C	۱/۰۷۰	۰/۴۲۶	۱/۱۱	۰/۵۹	۰/۹۱	۰/۲۷

جدول ۴- آزمون کروسکال والیس مقادیر mir-133a, RUNX2 و PPAR γ در مغز استخوان ران موش‌های صحرایی

متغیر	آماره	درجه آزادی ۱	P-value
Mir-133a-3p	۲/۱۸۷	۴	۰/۷۰۱
RUNX2	۰/۷۲۹	۴	۰/۹۴۸
PPAR γ	۴/۳۲۰	۴	۰/۳۶۴

بحث

نتایج نشان داد میزان بیان mir-133a, Runx2 و PPAR γ در ۴ تمرینی و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. یافته‌های پژوهش حاضر مغایر با مشاهدات قبلی است که نشان می‌دهد miRNAs در عضله اسکلتی و گردش خون (۲۸ و ۲۹) و Runx2 در بافت و مغز استخوان (۳۰ و ۳۱) و PPAR γ در بافت چربی و گردش خون به تمرین‌های ورزشی پاسخ می‌دهد. از سوی دیگر، تحریک مکانیکی مناسب می‌تواند تکثیر سلول‌های استئوبلاست را تقویت کند (۲۰).

علاوه بر این، اخیراً گزارش شده است که تمرینات مقاومتی ملکول‌های ریز درون بافت استخوانی در دوران سالمندی را تغییر می‌دهد (۲۰). اما علت مغایرت یافته‌های پژوهش حاضر با یافته‌های بالا می‌تواند مرتبط با برخی از دلایل احتمالی مانند سن موش‌های صحرایی (۳۲)، زمان کوتاه مطالعه و نوع بار مکانیکی اعمال شده، توضیح داده شود.

(۳۳). از طرفی پاسخ‌پذیری جوانان به فعالیت بدنی بهتر از افراد مسن است (۳۴). به عنوان مثال ترنر و همکارانش نشان داده‌اند که پاسخ استئوژنیک موش‌های جوان نسبت به موش‌های مسن بالاتر است، هر چند زمانی موش‌های مسن فعالیت می‌کنند، سلول‌های موش‌های مسن همانند موش‌های جوان دارای توانایی پاسخ‌گویی به بار مکانیکی بودند (۳۲). به نظر می‌رسد که برخی از تغییرات مرتبط با سن در سیگنال‌های مکانیکی، هورمون‌ها، عوامل رشد و سیتوکین‌ها موجب کاهش پاسخ اسکلت سالمندان به بار مکانیکی می‌شود (۳۵). همچنین توانایی بار مکانیکی برای فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ در استخوان به وسیله نوع بار مکانیکی اعمال شده بر استخوان تعیین می‌شود (۳۶) زیرا قدرت عضلانی با تراکم استخوان و تأثیر آن روی محل اسکلت ارتباط دارد (۳۷). مدت زمان کوتاه پژوهش حاضر

^۱Turner



نیز یکی از علل عدم تاثیر این نوع فعالیت بدنی بر متابولیسم استخوان بود. از آنجایی که اکثر مطالعاتی که تاثیر معنی-داری بر روی بازسازی استخوان داشتند بیش از ۱۵۰ تا ۲۰۰ روز طول کشیدند (۳۸). پیشنهاد می شود که فعالیت بدنی طولانی مدت برای حفظ توده استخوان ضروری باشد (۳۹).

یکی از علت های دیگر عدم اثربخشی این پروتکل های تمرینی بر عوامل مرتبط با متابولیسم استخوان را می توان توسط قانون فروست^۱ توضیح داد. فروست دو فرآیند تحلیل و تشکیل استخوان را در پاسخ به بار مکانیکی پیشنهاد کرد (۳۹) از سوی دیگر فروست در نظریه خود پیشنهاد می کند که ساختار استخوانی از طریق یک سیستم بازخوردی حفظ می شود بطوریکه افزایش فشار مکانیکی یا دینامیکی موجب تحریک استخوان شده و رشد و تشکیل استخوانی را به همراه دارد. این نظریه به عنوان نظریه وضعیت مکانیکی شناخته می شود. طبق این نظریه فشار مکانیکی باید در حدی باشد که بتواند موجب سبقت تشکیل یا بازسازی استخوان بر فرایند بازجذب استخوانی شود، این فشار مکانیکی حداقل آستانه فشار مؤثر نامیده می شود (۴۰). از این رو به احتمال زیاد در پژوهش هایی که تغییر در تراکم استخوانی دیده نمی شود مانند پژوهش حاضر یا به این علت بوده که شدت و بار تمرین در حداقل مقدار مؤثر قرار نداشته است که بتواند موجب بهبود تراکم استخوانی در استخوان ران گردد (۴۰) و یا طبق این قانون اگر استرس استخوان بیش از یک سطح معینی باشد، استئوکلاست ها بسیج می-شوند و بازسازی تغییر می کند (۴۱). به طور خلاصه، ما معتقدیم که سطح آستانه بار مکانیکی که بر متابولیسم استخوانی تاثیر می گذارد با سن تغییر می کند، اما قادر به تعیین ارزش آستانه در این مطالعه نبودیم.

^۱Frost

به نظر می رسد به منظور پاسخ استخوان به تمرین ورزشی در دوران سالمندی نیاز به دوره های تمرین طولانی تری نسبت به جوانان دارد. و در مطالعه حاضر، فاکتورهای مورد نظر فقط در مرحله پس آزمون اندازه گیری شده و از مقدار اولیه این فاکتورها در مرحله قبل و حین مداخله اطلاعاتی در دسترس نیست و این عامل هم می تواند از دیگر عوامل عدم دستیابی به نتایج معنی دار باشد و همچنین چون در این پژوهش نیاز به مغز استخوان افراد سالمند بود از موش صحرایی استفاده گردید و به دلیل عمر کوتاه موش صحرایی قادر به اجرای دوره تمرینی طولانی تری نبودیم و هر چند با توجه به محدودیت های این مطالعه و این که در این تحقیق مقدار پروتئین Runx2 اندازه گیری نشد و از آنجا که بیان ژن همواره به سنتز پروتئین هدف نمی انجامد، نیاز به تحقیقات بیشتر و با رویکرد اندازه گیری مقدار پروتئین Runx2 وجود دارد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن mir-133a، Runx2 و PPAR γ در ۵ گروه پس از هشت هفته تمرین مقاومتی و استقامتی با شدت های مختلف تفاوت معنی داری نداشت. بنابراین از آنجایی که تعداد سالمندان در کشور ما و سایر کشورها رو به افزایش است و نتایج بیشتر پژوهش ها تأثیر مثبت انجام فعالیت دنی بر عوامل فیزیولوژیکی در این سنین را تأیید نموده اند، بنابراین پیشنهاد می شود، تحقیقات بعدی به بررسی تأثیر تمرین مقاومتی و استقامتی با مدت زمان طولانی تر و شدت های متفاوت و همچنین تمرین های ترکیبی در افراد سالمند زن و مرد بپردازند

تشکر و قدردانی

هزینه اجرای این پژوهش توسط دانشجو تأمین شده است. پژوهشگران بدینوسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از

تحقیق ما را یاری کردند، اعلام می‌دارند.

مسئولان محترم آزمایشگاه حیوانات دانشگاه شهرکرد و

همچنین جناب دکتر مهدی خزایی که در اجرای پروتکل

References

1. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2001;2(3):165-71.
2. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- γ 2 transcription factor and TGF- β /BMP signaling pathways. *Aging cell* 2004;3(6):379-89.
3. Hong EH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, *et al.* TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005;309(5737):1074-8.
4. Lecka-Czernik, B. PPARs in bone: the role in bone cell differentiation and regulation of energy metabolism. *Curr Osteoporos Rep* 2010;8(2):84-90.
5. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 2014;28(28):269-86.
6. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, JIANG D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs* 2009;189(1-4):144-52.
7. Mansurabadi R, Abroun S, Hajifathali A, Asri A, Atashi A, Haghighi M. Expression of hsa-MIR-204, RUNX2, PPAR γ , and BCL2 in bone marrow derived mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients and normal individuals. *Cell J* 2017;19(Suppl 1):27-36.
8. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803(11):1231-43.
9. Liao XB, Zhang ZY, Yuan K, Liu Y, Feng X, Cui RR, *et al.* MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2013;154(9):3344-52.
10. Peng H, Lu SL, Bai Y, Fang X, Huang H, ZHUANG XQ. MiR-133a inhibits fracture healing via targeting RUNX2/BMP2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(9):2519-26.
11. Hell RCR, Ocarino NM, Boeloni JN, Silva JF, Goes AM, Santos RL, *et al.* Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Acta Physiologica* 2012;205(2):292-301.
12. Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM, Silva JF, Marubayashic U, Serakides R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide* 2008;19(4):320-5.



13. Gianoudis J, Bailey CA, Ebeling PR, Nowson CA, Sanders KM, Hill K, *et al.* Effects of a Targeted Multimodal Exercise Program Incorporating High-Speed Power Training on Falls and Fracture Risk Factors in Older Adults: A Community-Based Randomized Controlled Trial. *J Bone Miner Res* 2014;29(1):182-91.
14. Turner CH, Robling AG. Designing exercise regimens to increase bone strength. *Exerc Sport Sci Rev* 2003;31(1):45-50.
15. Altana V, Geretto M, Pulliero A. MicroRNAs and physical activity. *Microna* 2015;4(2):74-85.
16. Sherrington C, Whitney JC, Lord SR, Herbert RD, Cumming RG, Close JCT. Effective exercise for the prevention of falls: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc* 2008;56(12):2234-43.
17. Polakovičová M, Musil P, Laczo E, Hamar D, Kyselovič J. Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Exercise Response. *Int J Mol Sci* 2016;17(10):1553.
18. Chodzko-Zajko WJ, Proctor DN, Fiatarone Singh MA, Minson CT, Nigg CR, Salem GJ, *et al.* Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41(7):1510-30.
19. Chen Y, Wang S, Bu S, Wang Y, Duan Y, Yang S. Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR γ expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(8):1759-67.
20. 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* 2017;7:42878.
21. Cadore EL, Brentano MA, Kruel LFM. Effects of the physical activity on the bone mineral density and bone remodeling. *Rev Bras Med Esporte* 2005;11(6):373-9.
22. Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41(3):475-86.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, *et al.* A program of moderate physical training for wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res* 2007;21(3): 751-56.
27. Abbassi Dalooi A, Fani F, Abdi A. The effect of 8 weeks of endurance training and L-NAME on Apelin in adipose tissue in elderly male's rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport* 2016;4(8):77-88. [Persian].



28. 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):320-24.
29. 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.
30. 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.
31. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(9):1659-63.
32. 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.
33. Aido MIFd. The influence of age and mechanical loading on bone structure and material properties [Dissertation]. Graduate college of Berlin University; 2015 .
34. Going SB, Farr JN. Exercise and bone macro-architecture: is childhood a window of opportunity for osteoporosis prevention?. *Int J Body Compos Res* 2010;8:1-9.
35. 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.
36. 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.
37. Heinonen A, Oja P, Kannus P, Sievanen H, Haapasalo H, Mänttari A, *et al.* Bone mineral density in female athletes representing sports with different loading characteristics of the skeleton. *Bone* 1995;17(3):197-203.
38. Wheeler 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.
39. 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.
40. 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.
41. Turner C. Functional determinants of bone structure: beyond Wolff's law of bone transformation 1992; *Bone* 1992;13(6):403-9.



The effect of eight weeks of moderate and high intensity endurance and resistance training on expression mir-133a, Runx2 and PPAR γ on femur bone marrow in older male wistar rats

Zahra hemati farsani^{*1}, Ebrahim banitalebi¹, Mohamad Faramarzi¹, Amin Bigham-Sadegh²

1- Department of Exercise Physiology, Faculty of Literature and Humanities, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2- Department of Veterinary Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine Shahrekord University, Shahrekord Iran.

Original Article

Received: Jun 28, 2018

Accepted: Jan 3, 2019

***Corresponding Author:**

Zahra hemati farsani &
address: Department of Sport
Science, University of
Shahrekord, Shahrekord. Iran

TEL: 09137728628

Email:

hematyn.sport87@yahoo.com.

ABSTRACT

Introduction

The best way to prevent osteoporosis, at old age is to prevent bone loss and at young age is trying to keep bones healthy, therefore 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 (PPAR γ) in femur bone marrow Wistar elderly rats.

Materials and Methods

This experimental study was done on 40 Wistar male rats. They were divided into 5 equal groups (n=8) includ moderate or high intensity resistance training, moderate or high intensity endurance training and control. The two training groups completed 8 weeks of training program, 5 days a week according to protocol. After completing training, expression of mir-133a, Runx2 and PPAR γ were measured RT-PCR. The statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test with significance level of $P < 0.05$.

Results

There was no significance in expression of mir-133a ($P=0.701$), Runx2 (0.948) and PPAR γ ($P=0.364$) in 5 groups.

Conclusion

Investigating cellular changes in bone after such exercises requires longer periods of exercise that should be investigated in future research.

Keywords

bone metabolism, femur bone, mir-133a, Runx2, endurance and resistance training, PPAR γ

► **Please cite this article as:** The effect of eight weeks of moderate and high intensity endurance and resistance training on expression mir-133a, Runx2 and PPAR γ on femur bone marrow in older male wistar rats. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;6(4):22-34.