Sport and Exercise Physiology
Spring-Summer 2021/Vol.14/No.1/38-48

The effect of different resistance training intensities on expression of mir-204 and transcription factors of osteogenic, Runx2 and biomechanical properties on bone in old male wistar rats

Zahra Hemati Farsani[1*], Ebrahim Banitalebi[2], Mohamad Faramarzi[3], Amin Bigham-Sadegh[4]

1 Department of Physical Education and Sports Science, Ardakan University, Yazd, Iran

2 Department of Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3 Department of exercise physiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

4 Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Original Article

Abstract

Purpose: Bones are largely influenced by nutrition, activity levels and lifestyle, and structural adaptations in the form and size of the bone occur by the forces of weight bearing and forces applied by the muscles. Therefore, the aim of the present study was to determine whether different resistance training intensities affect on expression of mir-204 and transcription factors of osteogenic, Runx2 and biomechanical properties on bone in old male wistar rats.

Methods: This experimental study was done on 24 Wistar male rats (23 months old and with an average weight of 437.93 gram). They were randomly divided into three equal groups (n=8) include moderate (60% maximum voluntary carrying capacity: MVCC) and high intensity (80% MVCC) resistance training and control according to initial weight. The two training groups completed eight weeks of training program, five days a week according to resistance protocols. After completing training, expression of mir-204 on bone marrow were measured RT-PCR and Three – point bending test was used to determine bone biomechanical properties. The statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and one-way ANOVA test with significance level of $P < 0.05$

Results: There was no significance in expression of mir-204 ($P = 0.539$), Runx2 ($P = 0.960$), module ($P = 0.82$), stress ($P = 0.80$), fracture energy ($P = 0.99$) and bone force ($P = 0.81$) between the intervention groups and control group.

Conclusion: It seems that considering the lack of meaning in the results of this study, it seems that the duration of exercise was not sufficient to influence bone variables. then longer periods of this type of exercise exercise will be investigated in future research.

Keywords: Biomechanical properties, Resistance training, Mir-204, Runx2

How to cite this article: Hemati Farsani Z, Banitalebi E, Faramarzi M, Bigham-Sadegh A. The effect of different resistance training intensities on expression of mir-204 and transcription factors of osteogenic, Runx2 and biomechanical properties on bone in old male wistar rats. Sport and Exercise Physiology 2021;14(1):38-48

*Corresponding Author; E-mail: hematyn.sport87@yahoo.com
DOI: 10.52547/joeppa.14.1.38

Received: 09/12/2018 Accepted: 21/04/2021

فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
بهار و تابستان ۱۴۰۰/ دوره ۱۴/ شماره ۱/ صفحه‌های ۳۸-۴۸

تأثیر شدت‌های مختلف تمرین مقاومتی بر بیان microRNA -204 و عوامل نسخه‌برداری استئوژنز Runx2 و برخی خواص بیومکانیکی استخوان موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار

زهرا همتی فارسانی[1*]، ابراهیم بنی‌طالبی[2]، محمد فرامرزی[3]، امین بیغم صادق[4]

۱ گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه اردکان، یزد، ایران
۲ گروه علوم ورزشی، دانشکدة ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳ گروه فیزیولوژی ورزشی ، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۴ دانشکدة دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

مقاله پژوهشی

چکیده

هدف: استخوان‌ها به‌طور وسیعی تحت تأثیر تغذیه، سطح فعالیت و سبک زندگی قرار می‌گیرند و سازگاری‌های ساختاری در شکل و اندازة استخوان از طریق نیروهای ناشی از تحمل وزن و نیروهای اعمال‌شده توسط عضلات اتفاق می‌افتد. ازاین‌رو هدف از مطالعة حاضر این است که آیا شدت‌های مختلف تمرین مقاومتی بر بیان mir-204 و برخی خواص بیومکانیکی استخوان موش‌های نر سالمند نژاد ویستار تأثیر دارد؟

روش‌ها: سر موش نر سالمند نژاد ویستار (میانگین سن ۲۳ ماه، میانگین وزن ۴۳۷/۹۳ گرم) در سه گروه مساوی هشت‌تایی شامل تمرینات مقاومتی با شدت متوسط (۶۰ درصد حداکثر ظرفیت حمل ارادی (MVCC)) و تمرینات مقاومتی با شدت بالا (۸۰ درصد MVCC) و گروه کنترل قرار گرفتند و به‌طور تصادفی براساس وزن اولیه تقسیم شدند. تمرینات مقاومتی با استفاده از نردبان مقاومتی و ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته انجام گرفت. بعد از پایان دورة تمرین بیان mir-204 در بافت مغز استخوان درشت‌نئی به روش RT-PCR اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ کمی شدند. همچنین از آزمون خمش سه‌نقطه‌ای برای تعیین خواص بیومکانیکی استخوان استفاده شد. تحلیل آماری با استفاده از تحلیل واریانس تک‌راهه و آزمون کروسکال والیس با سطح $P\leq 0/05$ انجام گرفت.

نتایج: میزان بیان mir-204 (P=۰/۵۳۹)، Runx2 (P=۰/۹۶۰)، مدولاسیون (P=۰/۸۲)، قدرت بیشینه و استرس (P=۰/۸۰)، انرژی شکست (P=۰/۹۹) و نیروی استخوان (P=۰/۸۱) در گروه‌های تمرینی با شدت بالا و متوسط نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به عدم معناداری در نتایج تحقیق، به‌نظر می‌رسد مدت تمرین برای تأثیرگذاری بر متغیرهای استخوان کافی نبوده است، ازاین‌رو نیاز است دوره‌های طولانی‌تر این نوع تمرینات ورزشی، در تحقیقات آینده بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین مقاومتی، mir-204، RUNX2، خواص بیومکانیکی استخوان

* نویسنده مسئول: رایانامه: hematyn.sport87@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۱

مقدمه

استئوبلاست‌ها (سلول‌های تشکیل‌دهنده استخوان) و آدیپوسیت‌ها (سلول‌های چربی) از سلول‌های بنیادی مزانشیمال[1] (MSC) مغز استخوان نشأت می‌گیرند. به‌طور تقریبی با افزایش سن تعداد آدیپوسیت‌ها افزایش و استئوبلاست‌ها کاهش می‌یابد (۱). تنظیم‌کننده‌های اصلی تمایز MSC به آدیپوسیت‌ها و استئوبلاست‌ها به‌ترتیب گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر پروکسی‌زوم‌ها[2] (PPARγ) و عامل رونویسی مربوط به رانت[3] (RUNX2) هستند، پس احتمالاً RUNX2 هدف بالقوه برای درمان پوکی استخوان است (۱). RUNX2 به‌عنوان تنظیم‌کننده مثبت تمایز استئوبلاست توصیف شده است که می‌تواند بیان ژن پروتئین ماتریکس استخوانی، از جمله کلاژن نوع I آلفا ۱ [4](Col1a1)، استئوپونتین[5] (Opn)، سیلوپروتئین استخوانی[6] (Bsp) و استئوکلسین[7] (Ocn) را تنظیم کند (۲). همچنین، فعال شدن PPARγ نه‌تنها استئوبلاستوژنز را مهار می‌کند، بلکه سبب فعال شدن استئوکلاستوژنز می‌شود، در نتیجه به کاهش تشکیل استخوان و افزایش جذب استخوان منجر می‌شود (۱).

محرک‌های مختلف در تمایز MSC به بافت استخوانی تأثیر دارند (۱) و از عواملی که مانع تمایز MSC می‌شوند، می‌توان به MicroRNA (miRNA) اشاره کرد (۳)، زیرا گزارش شده است که تعداد زیادی از miRNAها تشکیل، جذب، بازسازی و تمایز استخوان را تنظیم می‌کنند (۴). MiRNAs نوعی از RNAهای اندوژن، کوچک، غیرکدونی هستند که طولشان حدود ۲۲ نوکلئوتید است و بیان ژن را با اتصال به منطقه ۳ بدون ترجمه mRNAها (3ÚTR) تنظیم می‌کنند تا به سرکوب ترجمه mRNA منجر شود (۵). از این miRNAs می‌توان به MIR-204 اشاره کرد که در MSC بیان شده و موجب القای تمایز آدیپوسیت و مهار بیان پروتئین RUNX2 می‌شود (۶). بیان غالب PPARγ توسط MSها در سالمندی با کاهش همزمان در بیان Runx2 وجود دارد، بنابراین سطوح تمایز استئوبلاست پایین‌تر است (۱).

به‌نظر می‌رسد استخوان‌ها به‌طور وسیعی تحت تأثیر تغذیه، سطح فعالیت و سبک زندگی قرار می‌گیرند و سازگاری‌های ساختاری در شکل و اندازه استخوان از طریق نیروهای ناشی از تحمل وزن و نیروهای اعمال‌شده توسط لیگامنت‌ها، تاندون‌ها و عضلات اتفاق می‌افتد (۷) و استحکام ساختاری استخوان اغلب به‌وسیله یک دستگاه بازخورد حس‌گر مکانیکی حفظ می‌شود. این دستگاه تغییرات ایجادشده در بار مکانیکی درون استخوان‌ها را حس می‌کند و چالش‌های حرکتی را از طریق تغییرات در اندازه و شکل استخوان نشان می‌دهد (۸). استخوان‌های جدید در مناطقی تشکیل می‌شوند که بار اعمال‌شده بر آن بیشتر از محدوده بار مکانیکی معمول است، درحالی‌که استخوان‌ها در مناطقی که بار مکانیکی کمتری نسبت به محدوده بار معمولی دارند، کاهش می‌یابند (۸). بنابراین، راه ساده و مؤثر برای افزایش توده و ساختمان استخوانی از طریق تحریک مکانیکی سلول‌های استخوانی است (۹). با این حال، شواهد از مطالعات حیوانی و انسانی نشان می‌دهد که یکی از بهترین انواع تمرینات ورزشی، تمرین قدرتی است، زیرا تأثیرات مطلوبی در حفظ یا افزایش توده استخوان دارد (۱۰). سینگیولانی و همکاران (۲۰۱۷) تأثیرات تمرینات قدرتی بر خواص مکانیکی استخوان و تمایز استئوژنیک MSC در موش‌های صحرایی مسن را بررسی کردند. موش‌های مسن تمرین‌کرده مقادیر بیشتری از تراکم مواد معدنی را نشان دادند و تمرینات قدرتی موجب افزایش بیان ژن Runx2 شد (۱۱).

miRNAs اخیراً به‌عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های مهم پیری سلولی و سالمندی شناخته شده است (۱۲). استئوآرتریت و پوکی استخوان، اختلالات اسکلتی مرتبط با سالمندی هستند (۱۳) و ۱۲ تا microRNAs به‌طور بالقوه سبب پیری استئوبلاست‌ها و این بیماری‌های اسکلتی می‌شوند و یکی از مهم‌ترین miRNAs که در پوکی استخوان درگیر است، بیان بالای miR-204 است که تنظیم‌کننده بالادست ۲۲ ژن کاندیدا در پیری استئوبلاست‌هاست (۱۳). همچنین، شواهد جدید نشان داده است که miRNAs در بازسازی مکانیسم استخوان ناشی از بارگذاری مکانیکی درگیرند (۱۴). برای نمونه، ناک‌اوت کردن miR 17-92 در استئوبلاست‌ها، تولید کلاژن نوع I را در پاسخ به دو هفته بار مکانیکی کاهش داد (۱۵) همچنین نشان داده شد که miR-103a یک miRNA حساس به بار مکانیکی است که از طریق Runx2، تمایز استئوبلاست را تنظیم می‌کند (۱۶). تحقیق دیگری نشان داد که miR-33-5p یک miRNA جدید حساس به بار مکانیکی است که می‌تواند تمایز استئوبلاست را افزایش دهد (۱۷). با وجود این، 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 قدرتی اشاره کرد (۱۸). به‌خوبی ثابت شده است که پاسخ استئوژنیک ناشی از ورزش وابسته به شدت است (۱۹- ۲۰)، بنابراین، فرض شده است که تمرین با شدت‌های مختلف به پاسخ‌های مختلف سلولی و در نتیجه سازگاری‌های مختلف استخوانی منجر می‌شود (۲۱). البته، تحقیقات علمی نشان می‌دهد که همه پروتکل‌های تمرینی به یک اندازه در بهبود توده استخوانی کارایی ندارند. برای نمونه، روش‌هایی وجود دارد که می‌تواند به‌طور چشمگیری بر کیفیت استخوانی تأثیر بگذارد (۲۲). همچنین شدت فعالیت می‌تواند بر تراکم استخوان تأثیر داشته باشد، به‌گونه‌ای که برخی مطالعاتی که اثربخشی تمرینات بدنی را نشان داده‌اند، از شدت فعالیت بالایی بهره گرفته‌اند (۲۳)، زیرا افزایش فشار بر استخوان از طریق تحمل وزن بیشتر، همچنین افزایش فشار بر استخوان از طریق افزایش انقباض عضلانی، بر میزان تراکم استخوان مؤثر است (۲۴).

با در نظر گرفتن نقش شناخته‌شده مسیر Runx2 در استئوژنز 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 بهبود خواص بیومکانیکی استخوان و برخی نشانگرهای تمایز استئوبلاست‌هاست. بنابراین، هدف از این مطالعه تعیین تأثیر تمرینات مقاومتی بر بیان miR-204 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی تشکیل و عملکرد Runx2 است. همچنین آگاهی از تأثیرات تعدیل‌شده پروتکل‌های تمرین‌های مختلف بر تغییرات ویژگی‌های بیومکانیکی پارامترهای بیومکانیکی (سختی، حداکثر مقاومت و انرژی شکست) استخوان به‌ویژه در افراد سالمند هنوز بسیار محدود است. بنابراین، فرض ما این است که تحریکات ارائه‌شده از طریق تمرینات ورزشی در دوره سالمندی، ممکن است به‌عنوان راه مفیدی با جلوگیری از پیام‌رسانی مولکولی داخل‌سلولی که منجر به پوکی استخوان می‌شود، به بهبود خواص بیومکانیکی استخوان عمل منجر شود. ازاین‌رو ضروری به‌نظر می‌رسد تا با توجه به نقش ورزش در کنترل پوکی استخوان و عدم بررسی سازوکارهای ریزمولکولی مؤثر بر اختلالات استخوانی، برای نخستین بار تغییرات سطح بیان برخی miRNA مغز استخوان در پاسخ به شدت‌های مختلف تمرین مقاومتی و استقامتی در موش‌های سالمند نژاد ویستار م بررسی شود.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: در پژوهش حاضر تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۴۳۸/۲۷ گرم در ۲۳ ماهگی از مؤسسه انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در شرایط دمایی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری و با غذای مخصوص موش صحرایی و آب تغذیه شدند. همچنین، تمامی قوانین و نحوه 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 گرفت. حیوان‌ها پس از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه با ترازوی دیجیتالی ۲۰۰۰ گرم با دقت یک‌دهم مدل SF-400A وزن‌گیری شدند و به‌صورت تصادفی براساس همسان‌سازی وزن اولیه موش‌ها به سه گروه با تعداد مساوی ۸ سر گروه کنترل (C) و تمرین مقاومتی با شدت متوسط (MIRT) و تمرین مقاومتی با شدت بالا (HIRT) تقسیم شدند. گروه کنترل تحت مداخله خاصی قرار نگرفت.

پروتکل پژوهش: پروتکل تمرین مقاومتی پژوهش به این صورت بود که موش‌ها در هر دو گروه تمرین مقاومتی با شدت زیاد و تمرین مقاومتی با شدت متوسط را به‌منظور آشناسازی با نحوه اجرای پروتکل تمرینی یک هفته بدون وزنه تمرین بالا رفتن از نردبان انجام دادند. پس از آخرین جلسه سازگاری، از حیوانات آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی۸ (MVCC) گرفته شد. سپس MVCC به‌عنوان بالاترین بار حمل‌شده موفقیت‌آمیز تعریف شد (۲۵). با توجه به سازگاری حیوانات با تمرین در انتهای هفته چهارم، مجدداً از حیوانات آزمون MVCC گرفته شد و شدت تمرین حیوانات براساس آزمون جدید تعیین شد (۲۶-۲۷).

پروتکل تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از 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 به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته بود (جدول ۱) (۲۶-۲۷).

آزمون به‌منظور تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی

جدول ۱. برنامهٔ تمرین مقاومتی با شدت متوسط و بالا به مدت ۸ هفته در موش‌های سالمند نژاد ویستار

نوع تمرین	تعداد جلسه در هفته	شدت فعالیت	تعداد وهله‌های فعالیت	استراحت بین وهله‌های فعالیت	تعداد هفته
MIRT	۵	۶۰ درصد MVCC	۱۴-۲۰ بار	۲ دقیقه	۸
HIRT	۵	۸۰ درصد MVCC	۹-۱۰ بار	۱ دقیقه	۸

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

(MVCC): به‌منظور تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی، وزنه ۷۵ درصد وزن بدن حیوان به دم آنها متصل شد و حیوان شروع به بالا رفتن از نردبان با حمل این بار کرد، سپس به ازای هر تکرار موفق ۳۰ گرم به بار تمرینی تکرارشده قبلی اضافه شد. در بالای نردبان دو دقیقه استراحت بین هر صعود وجود داشت. این روش تا زمانی‌که موش موفق به صعود کل طول نردبان در سه تلاش متوالی می‌شد، تکرار شد. اندازه‌گیری حداکثر ظرفیت حمل ارادی در شروع هفته اول و چهارم و در پایان هفته هشتم انجام گرفت (۲۵).

روش‌های آزمایشگاهی: استخراج بافت و آماده‌سازی نمونه‌های استخوانی به‌منظور اندازه‌گیری خمش سه‌نقطه‌ای: ۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی با تزریق درون‌صفاقی کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (سه- پنج میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند (۲۸).

درشت‌نئی راست به‌منظور مطالعه مورفومتری پس از پاکسازی بافت‌های نرم و استخراج مغز استخوان در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. درشت‌نئی راست از بافت نرم به‌منظور ارزیابی‌ها جدا شده و تا زمان انجام آزمون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد نگهداری شد (۲۹). سه ساعت قبل از آزمون، نمونه‌ها در دمای اتاق قرار داده شده و با سالین مرطوب شدند. سپس به آزمایشگاه خواص مکانیکی انتقال داده شدند و مورد آزمون نیروی خمشی سه‌نقطه‌ای (دستگاه SANTAM مدل DBBP-۵۰ ساخت کره قرار گرفتند.

طرز انجام این آزمون چنین بود که پس از انتخاب شاخص‌های مربوط به انجام آزمون در نرم‌افزار دستگاه، فک‌های دستگاه متناسب با آزمون خمشی سه‌نقطه‌ای تنظیم شد. پس از خروج نمونه استخوانی از داخل سرم فیزیولوژیک، بلافاصله روی دو تکیه‌گاه فلزی به‌صورت قدامی- خلفی روی فک‌های پایینی دستگاه قرار گرفت. سپس فک بالا به‌صورت عمودی بر محور طولی استخوان با سرعت ثابت ۱۰ میلی‌متر بر دقیقه حرکت کرد. برای اطمینان از یکپارچگی نقاط اعمال نیرو در همه نمونه‌های استخوان درشت‌نئی، با استقرار در دهانه کولیس روی سر دور از تنه (دیستال) و نزدیک به تنه (پروگزیمال) استخوان، نمونه استخوانی به‌گونه‌ای روی پایه‌های دستگاه جای گرفت که نقطه اثر نیروی دستگاه، درست در نقطه میانی بافت استخوان، وارد شود. بار اعمال‌شده هنگام گسیختگی بافت استخوانی و منحنی نیرو - جابه‌جایی به‌طور خودکار توسط نرم‌افزار دستگاه ترسیم شد و در نمایشگر رایانه متصل به دستگاه، ثبت شد (۳۰).

آماده‌سازی نمونه‌های مغز استخوانی به‌منظور اندازه‌گیری مولکولی-سلولی: روش جمع‌آوری مغز استخوان بدین‌صورت بود که ابتدا استخوان تیبیا جدا شد 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 شماره ۱۸ و سرنگ پیستون‌دار مغز استخوان استخراج و در میکروتیوب‌های فاقد آنزیم RNase قرار گرفتند، نهایت مغز استخوان‌های جمع‌آوری‌شده ابتدا در تانک نیتروژن و سپس در دمای ۸۰- درجه منجمد شده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

استخراج RNA: استخراج محتوی RNA کل با استفاده از کیت ایرایزول (IraiZol kit RB1001، زیست‌فناوران رنا، اصفهان، ایران)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. میقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت مغز استخوان، در هاون استریل در حضور یک میلی‌لیتر از بافر ایرایزول سائیده شد تا محلول همگن به‌وجود آید و سپس به لوله استریل دو میلی‌لیتر منتقل و به مدت پنج دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به آن افزوده و ۱۵-۱۰ ثانیه به‌شدت تکان داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در محیط قرار

گرفت. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از انتقال فاز شفاف-رویی به لوله جدید، به‌منظور رسوب دادن نوکلئیک اسیدها یک میلی‌لیتر اتانول مطلق سرد به آن افزوده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در C°20- قرار داده شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و پس از حذف فاز رویی، یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد، به‌منظور شست‌وشو، 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) به‌وسیله دستگاه نانودراپ (NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8، ترموفیشرساینتیفیک، آمریکا) مشخص شد.

سنتز cDNA: ابتدا به‌منظور حذف آلودگی احتمالی DNA، از محصول RNA استخراجی، از آنزیم DNaseI (زیست‌فناوران رنا، اصفهان، ایران) استفاده شد. مقدار ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNaseI (2U /µl) و یک میکرولیتر بافر (X۱۰) به پنج میکروگرم RNA افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در C°۳۷ قرار داده شد، سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت RB cDNA synthesis (زیست‌فناوران رنا، اصفهان، ایران)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. در مراحل سنتز cDNA از دو آغازگر مختلف استفاده شد. برای سنتز cDNA ژن miR-204 از آغازگر اختصاصی mir و برای سنتز cDNA ژن‌های RUNX2 و Actin mus از آغازگر عمومی Oligo dT (mer 16) استفاده شد.

واکنش Real-Time PCR: طراحی آغازگرها برای تکثیر کامل ژن miR-204 و تکثیر بخشی از ژن‌های RUNX2 و Actin mus انجام گرفت (جدول ۲). برای ارزیابی بیان ژن‌های miR-204 و RUNX2 از دستگاه ترموسایکلر (Applied biosystem مدل Step One 48 well، ترموفیشرساینتیفیک، آمریکا) و مستر ریل تایم RB S3p SYBR Green Master Mix (2X) (زیست‌فناوران رنا، اصفهان، ایران)، طبق برنامه ارائه‌شده توسط شرکت‌های سازنده به روش Quantitation-Comparative Ct (ΔΔCt)، انجام گرفت. برای این منظور مخلوط واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر، از ترکیب ۱۰ میکرولیتر مستر ریل

جدول ۲. توالی آغازگرهای RUNX۲ ، miR-۲۰۴ و Actin mus

نام پرایمر		توالی آغازگرها ۵'.....۳'	دمای اتصال	طول قطعه PCR	شمارهٔ دسترسی
Actin mus	F	ATG GTG GGT ATG GGT CAG AAG G	۵۶℃	bp 265	NM_031144.3
	R	TGG CTG GGG TGT TGA AGG TC			
RUNX۲	F	CCG GGA ATG ATG AGA ACT A	۵۳℃	bp 198	XM_017596552
	R	GAC CGT CCA CTG TCA CTT T			
۲۰۴-mir	F	TTC CCT TTG TCA TCC TAT GCC T	۵۵℃	-	NR_031919.1

تایم، ۱۰۰ نانوگرم cDNA و ۰/۲۵ میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، آماده شد و با برنامه دمایی C°۹۵ (واسرشت اولیه) ۵دقیقه و ۴۵ چرخه به‌صورت C°۹۵ (واسرشت) C°۱۵ ثانیه، دمای اختصاصی (جدول ۲) هر جفت آغازگر (اتصال) ۲۵ ثانیه و C°۷۲ (گسترش) ۳۰ ثانیه، در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد. به‌منظور ارزیابی صحت انجام واکنش و تکثیر اختصاصی آغازگرها، منحنی ذوب در بازه دمایی C°۹۵-۶۰ ترسیم شد.

پس از اتمام واکنش qPCR، چرخه آستانه (Ct) که نمایانگر تعداد نسخه‌های اولیه mRNA و میزان بیان ژن است، به‌وسیله نرم‌افزار StepOne (V. ۲،۳، ترموفیشرساینتیفیک، ABI، آمریکا)، برای هریک از نمونه‌ها تعیین شد. در این مطالعه به‌منظور به‌دست آوردن کارایی جفت آغازگرها از نرم‌افزار LinRegPCR (V. ۲۰۱۲، آمستردام، هلند) استفاده شد. میزان کارایی به‌دست‌آمده برای جفت آغازگرها تقریباً با هم مشابه بود، به همین دلیل برای سنجش نسبی بیان متغیرهای موردنظر از رابطه ریاضیاتی $2^{-Ct\Delta\Delta}$ استفاده شد (۳۱). در این تحقیق از ژن Actin mus به‌عنوان کنترل داخلی برای طبیعی‌سازی داده‌های بیان ژن استفاده شد. در رابطه

ΔCt_1، $۲^{-Ct\Delta\Delta}$ از تفریق Ctهای ژن هدف از Ctهای کنترل داخلی، و ΔCt_2 از تفریق Ct های ژن هدف از میانگین Ctهای گروه شم به‌دست آمد. بدین‌ترتیب مقادیر نسبی بیان ژن که از رابطه $۲^{-Ct\Delta\Delta}$ به‌دست آمدند، در تمام نمونه‌های cDNA قابل مقایسه بودند و هیچ‌کدام از داده‌های مربوط به نمونه‌های کنترل حذف نخواهد شد.

تحلیل آماری: به‌منظور بررسی برابری واریانس‌ها از آزمون لوین و برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. برای بررسی اثربخشی مداخلات بر بیان ژن‌های Runx2 و miR-204 از آزمون کروسکال والیس و برای مقایسه تغییرات وزن، MVCC و خواص بیومکانیکی استخوان‌ها از آزمون آنوا تک‌راهه (ANOVA ONE WAY) استفاده شد. تحلیل آماری

جدول ۳. میانگین تغییرات وزن (گرم) و MVCC (گرم) در دو گروه تمرین مقاومتی با شدت متوسط و بالا و گروه کنترل پس از ۸ هفته مداخلة تمرینی در موش‌های سالمند

متغیرها	گروه‌ها	تعداد	وزن اولیه (گرم)		وزن هفتة چهارم (گرم)		وزن نهایی (گرم)	
			میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
وزن (گرم)	HIRT	۸	۴۳۴/۱	۳۷/۸	۴۳۴/۳۷	۳۹/۲	۴۲۴/۶	۳۵
	MIRT	۸	۴۳۴/۲	۳۷/۹	۴۲۵	۳۸/۹	۴۲۶	۳۸/۷
	C	۸	۴۴۵/۵۰	۲۴/۰۷	۴۵۲	۳۰/۹۳	۴۴۱/۸۷	۲۷/۹۵
	P Values		۰/۸۳۲		۰/۵۲۸		۰/۵۷۸	
MVCC (گرم)	HIRT	۸	۳۲۵	۳۵/۰۴	۴۲۱/۸	۱۶۵/۷	۵۶۳/۵	۷۹/۶
	MIRT	۸	۳۴۰/۸	۴۱/۶	۴۲۵/۲	۸۱/۹	۴۷۴/۷	۷۳/۶
	C	۸	۳۴۰/۷	۳۴/۶	۳۴۳	۱۰۹/۳	۳۴۳/۲	۱۰۹/۹

نتایج آزمون آنوا تک‌راهه. سطح معناداری P>۰/۰۵. تمرین مقاومتی با شدت متوسط (MIRT) و تمرین مقاومتی با شدت بالا (HIRT) و گروه کنترل (C)

جدول ۴. مقایسة مقادیر mir-۲۰۴ و Runx ۲ در دو گروه تمرین مقاومتی با شدت متوسط و بالا و گروه کنترل پس از ۸ هفته مداخلة تمرینی در موش‌های سالمند

گروه‌ها	تعداد	MIR-204		Runx2	
		میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
HIRT	۸	۰/۶۷	۰/۵۱	۱/۰۹	۰/۴۰
MIRT	۸	۰/۸۳	۰/۴۱	۰/۸۵	۰/۳۳
C	۸	۱/۱۴	۰/۶۰	۱/۲۷	۱/۰۳
P Values		۰/۵۳۹		۰/۹۶	

نتایج آزمون کروسکال والیس به‌منظور مقایسة تغییرات بین‌گروهی. سطح معناداری P>۰/۰۵، تمرین مقاومتی با شدت متوسط (MIRT) و تمرین مقاومتی با شدت بالا (HIRT) و گروه کنترل (C)

جدول ۵. تحلیل واریانس یک‌راهه برای مقایسه ویژگی‌های بیومکانیکی استخوان موش‌های صحرایی در سه گروه تمرین مقاومتی شدید، متوسط و گروه کنترل با روش خمش سه‌نقطه‌ای

متغیر	گروه	میانگین	انحراف استاندارد	F	P
	C	۱۳۳/۸۶	۹/۴۰		
نیرو یا بار (نیوتن)	MIRT	۱۵۶/۴۶	۶۸/۴۷	۰/۲۱	۰/۸۱
	HIRT	۱۵۶/۶۰	۳۵/۳۹		
	C	۱۰/۵۱	۱/۴۹		
قدرت استخوان یا استرس (مگاپاسکال)	MIRT	۱۲/۶۴	۱/۹۹	۰/۲۲	۰/۸۰
	HIRT	۱۱/۷۶	۳/۴۴		
	C	۶۲/۶۲	۷/۶۰		
انرژی (ژول)	MIRT	۶۵/۷۵	۲۵/۶۰	۰/۲۵	۰/۹۹
	HIRT	۶۰/۸۶	۲۵/۳۱		
	C	۱۶۴۲/۱	۲۲۴/۳۴		
مدولاسیون (مگاپاسکال)	MIRT	۲۴۱۳/۶	۶۴۵/۵۹	۰/۱۹	۰/۸۲
	HIRT	۲۲۰۴/۷	۱۰۸۵/۵۳		
	C	۰/۵۸	۰/۰۹		
تغییر شکل تا نقطهٔ حداکثر استحکام (میلی‌متر)	MIRT	۰/۵۵	۰/۱۴	۰/۲۵	۰/۷۷
	HIRT	۰/۵۰	۰/۱۲		

نتایج آزمون آنوا تک‌راهه. سطح معناداری P>۰/۰۵. تمرین مقاومتی با شدت متوسط (MIRT) و تمرین مقاومتی با شدت بالا (HIRT) و گروه کنترل (C)

با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت. معنادار بودن تفاوت‌های داده‌ها در سطح P≤ ۰/۰۵ محاسبه شد.

نتایج

جدول ۳ تغییرات وزن و MVCC موش‌های صحرایی سالمند را در گروه‌های مختلف مطالعه نشان می‌دهد. نتایج نشان داد میزان بیان mir-204، خواص بیومکانیکی و وزن در سه گروه مقاومتی شدید، متوسط و گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت (P>۰/۰۵) (جدول‌های ۳، ۴و ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، بار مکانیکی از طریق ۸ هفته تمرین مقاومتی با شدت‌های مختلف بر بیان mir-204، Runx2 و همچنین خواص بیومکانیکی در موش‌های صحرایی نر به‌منظور تعمیم اثر بار مکانیکی بر استئوژنز بررسی شد که داده‌ها نشان داد بیان ژن mir-204، Runx2 در سه گروه پس از ۸ هفته تمرین مقاومتی با شدت‌های مختلف تفاوت معناداری نداشت. یافته‌های پژوهش ما مغایر با مشاهدات قبلی است که نشان می‌دهد برخی microRNAs در عضله اسکلتی و گردش خون (۳۲) و Runx2 در بافت و مغز استخوان (۳۳) به تمرین‌های ورزشی پاسخ می‌دهد. از سوی دیگر، تحریک مکانیکی

مناسب می‌تواند تکثیر سلول‌های استئوبلاست را تقویت کند (۱۱). علاوه‌بر این، اخیراً گزارش شده است که تمرینات مقاومتی مولکول‌های ریز درون بافت استخوانی در دوران سالمندی را تغییر می‌دهد (۱۱). اما علت مغایرت یافته‌های پژوهش حاضر با یافته‌های بالا می‌تواند مرتبط با برخی دلایل احتمالی مانند سن موش‌های صحرایی (۳۴)، زمان کوتاه مطالعه و نوع بار مکانیکی اعمال‌شده باشد (۳۵). از طرفی پاسخ‌پذیری جوانان به فعالیت بدنی بهتر از افراد مسن است (۳۴). برای نمونه، ترنر ۹و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که پاسخ استئوژنیک موش‌های جوان نسبت به موش‌های مسن بالاتر است، هرچند زمانی که موش‌های مسن فعالیت می‌کردند، سلول‌های موش‌های مسن همانند موش‌های جوان دارای توانایی پاسخگویی به بار مکانیکی بودند (۳۴). به‌نظر می‌رسد برخی تغییرات مرتبط با سن در پیام‌های مکانیکی، هورمون‌ها، عوامل رشد و سیتوکین‌ها موجب کاهش پاسخ اسکلت سالمندان به بار مکانیکی می‌شود (۳۶). همچنین توانایی بار مکانیکی برای فعال کردن مسیرهای پیام‌رسانی در استخوان به‌وسیله نوع بار مکانیکی اعمال‌شده بر استخوان تعیین می‌شود (۲۲)، زیرا قدرت عضلانی با تراکم استخوان و تأثیر آن روی محل اسکلت ارتباط دارد (۳۷). از آنجایی که بیشتر مطالعاتی که تأثیر معناداری بر بازسازی استخوان داشتند، بیش از ۱۵۰ تا ۲۰۰ روز طول کشیدند مدت زمان کوتاه پژوهش حاضر نیز از علل عدم تأثیر این نوع فعالیت بدنی بر این عوامل مرتبط با استخوان بود (۳۸). به‌نظر می‌رسد فعالیت بدنی طولانی‌مدت برای حفظ توده استخوان ضروری است (۳۸).

همچنین نتایج نشان داد که تمرینات ورزشی مقاومتی در شدت‌های مختلف تغییری در خواص بیومکانیکی استخوان تیبیای موش‌های صحرایی سالمند تمرین‌کرده نسبت به موش‌های گروه کنترل ایجاد نکرد. نتایج کنونی متفاوت با نتایج مطالعه سینگیولانی و همکاران بود. آنها گزارش کرده بودند که ۱۶ هفته تمرینات قدرتی سبب ایجاد تأثیرات مفید در پارامترهای بیومکانیک بافت استخوانی موش‌های تمرین‌کرده در مقایسه با گروه کنترل شد (۱۱). توضیح قابل قبول برای عدم سازگاری مطالعه حاضر با مطالعات قبلی ممکن است مربوط به بار مکانیکی متفاوت، روش اندازه‌گیری، سن و میزان استرین متفاوت حیوانات باشد (۳۹). علاوه‌بر این، قبلاً گزارش شده بود که این طول دوره تمرین (۸ هفته) تفاوت معناداری در خواص بیومکانیکی ایجاد نکرده بود؛ بدان‌معنا که حتی هنگام استفاده از تمرین مقاومتی شدید، مدت تمرین نقش اساسی در انطباق استخوان‌ها دارد (۴۰).

به‌طور کلی می‌توان گفت از دلایل احتمالی عدم نتیجه‌گیری تغییر بیان microRNA-204 و عامل نسخه‌برداری استئوژنز Runx2 و برخی خواص بیومکانیکی استخوان در تحقیق حاضر می‌تواند سن شروع تمرین باشد، چون در بیشتر تحقیقاتی که تمرین مؤثر بوده، موش‌ها در سن رشد و جوانی بوده‌اند. دلیل احتمالی دیگر می‌تواند مدت زمان تمرین باشد، شاید سالمندان به دوره‌های تمرین با زمان بیشتر پاسخ دهند که این موضوع به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد. به‌نظر می‌رسد به‌منظور پاسخ استخوان به تمرین ورزشی در دوران سالمندی به دوره‌های تمرین طولانی‌تری نسبت به جوانان نیاز است. در مطالعه حاضر، عوامل موردنظر فقط در مرحله پس‌آزمون اندازه‌گیری شد و از مقدار اولیه این عوامل در مرحله قبل و حین مداخله اطلاعاتی در دسترس نیست و این عامل هم می‌تواند از دیگر عوامل عدم دستیابی به نتایج معنادار باشد. همچنین چون در این پژوهش به مغز استخوان افراد سالمند نیاز بود، از موش صحرایی استفاده شد و به‌دلیل عمر کوتاه موش صحرایی قادر به اجرای دوره تمرینی طولانی‌تری نبودیم.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن mir-204، Runx2 و خواص بیومکانیکی استخوان در سه گروه پس از ۸ هفته تمرین مقاومتی با شدت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت و احتمالاً زمان کوتاه تمرین علت عدم ایجاد تغییر معنادار بر بافت و مغز استخوان است، بنابراین پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی تأثیر تمرین مقاومتی و استقامتی با مدت زمان طولانی‌تر در افراد سالمند زن و مرد بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکتری رشته بیوشیمی و متابولیسم ورزشی دانشگاه شهرکرد است. پژوهشگران مراتب قدردانی و تشکر خود را از مسئولان محترم آزمایشگاه حیوانات دانشگاه شهرکرد که در اجرای پروتکل تحقیق ما را یاری کردند، همچنین از دکتر

مهدی خزایی برای حمایت تکنیکی در تجزیه‌وتحلیل سلولی و مولکولی، اعلام می‌دارند.

پی‌نوشت‌ها

1 Mesenchymal Stem Cell
2 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
3 Runt-Related Transcription Factor 2
4 Collagen Type I
5 Osteopontin
6 Bone Sialo-Protein
7 Oscteoclacin
8 Maximum Voluntary Carrying Capacity
9 Turner

منابع

1. Schwartz AV. Marrow fat and bone: review of clinical findings. Frontiers in endocrinology. 2015; 6 (40): 1-6.
2. Zhang Y, Gao Y, Cai L, Li F, Lou Y, Xu N, et al. MicroRNA-221 is involved in the regulation of osteoporosis through regulates RUNX2 protein expression and osteoblast differentiation. American journal of translational research. 2017; 9(1): 126–135.
3. Chen H, Ji X, She F, Gao Y, Tang p. miR-628-3p regulates osteoblast differentiation by targeting RUNX2: Possible role in atrophic non-union. International journal of molecular medicine. 2017; 39(2): 279-286.
4. Feichtinger X, Muschitz C, Heimel P, Baierl A, Fahrleitner-Pammer A, Redl H, et al. Bone-related Circulating MicroRNAs miR-29b-3p, miR-550a-3p, and miR-324-3p and their Association to Bone Microstructure and Histomorphometry. Scientific reports. 2018; 8(1): 4867.
5. Chang H, Wang Y, Liu H, Nan X, Wong S, Peng S, et al. Mutant Runx2 regulates amelogenesis and osteogenesis through a miR-185-5p-Dlx2 axis. Cell death & disease. 2017; 8(12): 3221.
6. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. Stem cells. 2010; 28(2): 357-364.
7. Cole JH, van der Meulen MC. Whole bone mechanics and bone quality. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2011; 469(8): 2139-49.
8. Peterson KJ. Mechanical Properties of Bone Due to SOST Expression: A 3-Point Bending Assessment of Murine Femurs. 2012; 49: 1-174
9. Turner CH, Robling AG. Mechanisms by which exercise improves bone strength. Journal of bone and mineral metabolism. 2005; 23(1): 16-22.
10. Kerr D, Ackland T, Maslen B, Morton A, re-chard p. Resistance training over 2 years increases bone mass in calcium-replete postmenopausal women. Journal of Bone and Mineral Research. 2001; 16(1): 175-181.
11. 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. Scientific reports. 2017; 7: 42878.
12. Smith-Vikos T, Slack FJ. MicroRNAs and their roles in aging. J Cell Sci. 2012; 125(1): 7-17.
13. Chen YJ, Chang WA, Huang MS, Chen CH, Wang KY, Hsu YL, et al. Identification of novel genes in aging osteoblasts using next-generation sequencing and bioinformatics. Oncotarget. 2017; 8(69): 113598.
14. 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): 1239-1245.
15. 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. Physiol Genomics. 2014; 47(2): 33-43.
16. 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): 330-345.
17. 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
18. Cadore EL, Brentano MA, Kruel LFM. Effects of the physical activity on the bone mineral density and bone remodelation. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 2005; 11(6): 373-379.
19. Bailey C, Brooke-Wavell K. Exercise for optimising peak bone mass in women: Postgraduate Symposium. P Nutr Soc. 2008; 67(1): 9-18.
20. 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. International JSHS. 2006; 4: 10-18.
21. 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.
22. Gregov C, Šalaj S. The Effects of Different training modalities on bone mass: a Review. Kinesiology: International journal of fundamental and applied kinesiology. 2014, 46(1): 10-29.
23. 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; 89:4383–87.
24. Maddalozzo GF, Snow CM. High intensity resistance training effects on bone in older men and women. Calcif Tissue Int. 2000; 66:399–404.
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. 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.
27. 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.
28. 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].
29. Drummond LR, Carlo RD, Silva KAD, Rodrigues AC, Soares PNP, Gomes TNP, et al. Enhanced femoral neck strength in response to weightlifting exercise training in maturing male rats. International SportMed Journal. 2013; 14(3): p. 155-167.
30. Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Tanaka Y, Nakamura T, Suzuki M. Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats. J Bone Miner Res. 2001; 16(1):166-74.
31. 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.
32. Renno AC, Silveira Gomes AR, Nascimento RB, Salvini T, Parizoto N. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. Experimental gerontology. 2007; 42(6): 517-522.
33. 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. JBMR. 2012; 27(6): 1263-1274.
34. Aido MIFd. The influence of age and mechanical loading on bone structure and material properties. TU Berlin: IBMS BoneKE. 2015;2015: 84-88.
35. 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.
36. Razi H, Birkhold AI, Weinkamer R, Duda GN, Willie BM, Checa S. Aging leads to a dysregulation in mechanically driven bone formation and resorption. JBMR. 2015; 30(10): 1864-1873.
37. janz KF, Letuchy EM, Burns TL, Francis SL, Levy SM. Muscle Power Predicts Adolescent Bone Strength: Iowa Bone Development Study. Med Sci Sports Exerc. 2015;47(10):2201-6.
38. 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.
39. Tavafzadeh SS, Ooi FK, Chen CK, Sulaiman SA, Hung LK. Bone mechanical properties and mineral density in response to cessation of jumping exercise and honey supplementation in young female rats. BioMed research international. 2015; 2015.
40. Kemmler W, von Stengel S, Kohl M. Exercise frequency and bone mineral density development in exercising postmenopausal osteopenic women. Is there a critical dose of exercise for affecting bone? Results of the Erlangen Fitness and Osteoporosis Prevention Study. Bone. 2016. 89: 1-6.