Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

اثر تمرین هوازی با شدت متوسط بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز و نشانگران واگردش سرمی استخوان در زنان یائسه کم‌تحرک

بختیار ترتیبیان[۱]، زینب شیخلو[۲*]
عباس مآل‌اندیش[۲]، محمد رحمتی یامچی[۳]، رقیه افسرقره‌باغ[٤]

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، گروه آسیب‌شناسی و حرکات اصلاحی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه علامه طباطبائی، تهران، ایران.
۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
٤- گروه قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول: ارومیه، خیابان بعثت ۲، کوی هشتم، پلاک ۱۸.
تلفن: ۲۲۳۲۲۳٦ -۰٤٤۳
E-mail: z.sheikhlou@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۰ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۰/۲٤ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۰/۳۰

زمینه و هدف: نتایج مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی هوازی با تحریک سلول‌های استخوان‌ساز باعث پیشگیری از پوکی استخوان در دوران یائسگی می‌شود. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ۱۲ هفته تمرینات هوازی با شدت متوسط بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز، سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید و کلسیم در زنان کم‌تحرک بود.

روش بررسی: این پژوهش یک مطالعهٔ نیمه‌تجربی است که در شهریور ماه سال ۱۳۹٤ در دانشگاه ارومیه انجام گردید. زنان یائسهٔ کم‌تحرک ٦٥-٥٠ سال شهرستان ارومیه، جامعهٔ آماری این پژوهش را تشکیل دادند. ۲۰ آزمودنی داوطلب و واجد شرایط با میانگین سنی ۲/۱۲±٦۰ سال و شاخص تودهٔ بدن ۳/۲٤±۲۹/٤٦ kg/m^2 به‌صورت تصادفی در دو گروه تمرین (۱۰ زن) و کنترل (۱۰ زن) با روش نمونه‌گیری تصادفی در این پژوهش شرکت نمودند. گروه تمرین به مدت ۱۲ هفته، هر هفته سه جلسه و در هر جلسه به مدت ٦۰-٥۰ دقیقه تمرینات هوازی پیاده‌روی و دوی سبک را با شدت ٦٥ تا ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین اجرا کردند، در حالی‌که گروه کنترل در هیچ مداخله‌ای شرکت نداشتند. از گروه تمرین و کنترل ۲٤ ساعت پیش و پس از ۱۲هفته برنامه‌ی تمرینی به‌منظور اندازه‌گیری بیان ژن آلکالین فسفاتاز و مارکرهای سرمی استخوان نمونه‌گیری خون به‌عمل آمد. ارزیابی بیان ژنی با دستگاه Real-time RT-PCR (Applied, USA) و مارکرهای سرمی استخوان با دستگاه‌های Auto-analyzer (Biotechnica, Italy) و ELISA reader (Stat Fax-4200, Awareness Inc., USA) صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بیان ژن آلکالین‌فسفاتاز و هورمون پاراتیرویید پس از ۱۲ هفته تمرینات هوازی شدت متوسط در بین گروهی افزایش معناداری داشتند (به‌ترتیب P=۰/۰۲۷ و P=۰/۰۰٦)، ولی سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز و کلسیم تفاوت معناداری نداشتند (به‌ترتیب P=۰/۹٤۱ و P=۰/۹۹۰).

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر آن است که ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با ٦٥ تا ۷۰٪ بیشینه ضربان قلب تمرین بیان ژن آلکالین فسفاتاز و هورمون پاراتیرویید را در زنان یائسهٔ کم‌تحرک افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: فعالیت ورزشی هوازی، بیان ژن آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید، کلسیم، یائسگی.

مقدمه

پدیدهٔ کاهش تراکم استخوانی و پوکی استخوان ناشی از آن برای زنان یائسه یک پدیدهٔ شناخته شده بوده و شکستگی‌های ناشی از این عارضه از عوامل اصلی مرگ و میر در افراد مسن، به‌ویژه زنان یائسه است.[۱و۲] از سوی دیگر، اختلالات مربوط به کم تحرکی نیز از دیگر عواملی هستند که پوکی استخوان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مکانیسم‌های سلولی و مولکولی و عوامل هورمونی در متابولیسم استخوان درگیر هستند که می‌توان به ژن آلکالین فسفاتاز، سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید، کلسیم، هورمون‌های

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

جنسی اشاره کرد.[۲] ژن آلکالین فسفاتاز بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱ در موقعیت ۳٦/۱۲ با وزن مولکولی ۱٤۰ کیلو دالتون واقع شده است که دارای ۱۲ اگزون و ۱۱ اینترون است.[۳] آلکالین فسفاتاز یا ایزوفروم غیراختصاصی بافتی، آنزیمی است که به‌وسیلهٔ ژن آلکالین فسفاتاز کدگذاری می‌شود.[٤و٥] این آنزیم از مارکرهای تشکیل استخوان و یک گلیکوپروتیین تترامریک است که بیشتر در کبد و مغز استخوان ترشح شده و از دستهٔ هیدرولازها با نیمه عمر ۷ تا ۱۰ روز است.[٤]

هورمون پاراتیرویید نیز پپتیدی ساده با وزن مولکولی ۹۵۰۰ دالتون است که از ۸٤ اسید آمینه تشکیل شده است و فعالیت زیستی آن مربوط به ردیف اسید آمینه‌های ۳٤-۱ در انتهای آمینوی آن است. افزایش این هورمون، گیرندهٔ آن را در سلول‌های استخوان‌ساز یعنی استئوبلاست‌ها تحریک می‌کند.[٦و۷] کلسیم از بیشترین مواد معدنی موجود در بدن است که به تنظیم ضربان قلب، انتقال پیام‌های عصبی، انقباض عضلات و تشکیل استخوان کمک می‌کند.[٤] یون کلسیم با فرمول مولکولی Ca+2 و وزن مولکولی برابر با ٤۰/۰۷۸ g/mol است. میزان کلسیم موجود در بدن، تعیین‌کنندهٔ سلامت استخوان است و در استخوان‌ها به‌صورت ترکیب کلسیم‌فسفات رسوب کرده و باعث استحکام/مینرالیزاسیون استخوان می‌شود. به‌نظر می‌رسد تعادل بین هورمون پاراتیرویید و ویتامین D نقش اساسی را در هموستاز کلسیم و در نهایت تغییرات بافت استخوانی دارد.

فعالیت بدنی نیز از تعیین‌کننده‌های مهم تودهٔ استخوان به‌شمار می‌رود. در بافت استخوان، ذخیرهٔ کلسیم به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ درون سلولی در پاسخ به فعالیت ورزشی بیشتر می‌شود. فعالیت ورزشی با تحمل وزن، محرک استئوژنیک استخوان است. مطالعات زیادی پیرامون تاثیر فعالیت‌های ورزشی بر مارکرهای سرمی سوخت و ساز استخوان مورد بررسی قرار گرفته‌اند که نتایج آن‌ها به‌طور کامل ضد و نقیض است.[۱و٦و۷] اگرچه هنوز سازوکارهای دقیق فعالیت ورزشی با تحمل وزن در پیشگیری از بیماری پوکی استخوان و یا بهبود مارکرهای استخوان نامشخص هستند، اما روشن است که افزایش فشار مکانیکی بر بافت استخوان باعث سازگاری‌های فیزیولوژیک می‌شود که از بیماری‌های اسکلتی مانند پوکی استخوان پیشگیری می‌کند.[۱و۲و۱۱-۸] پیشگیری از بیماری‌های دستگاه اسکلتی مانند پوکی استخوان، به‌ویژه در زنان یائسهٔ کم‌تحرک، راه‌کار مناسبی نسبت به درمان این نوع بیماری‌ها محسوب می‌شود.[۱] هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت متوسط ٦۵ تا ۷۰٪ بیشینه ضربان قلب تمرین بر مارکرهای تودهٔ استخوانی از جمله بیان ژن آلکالین فسفاتاز، سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید و کلسیم در زنان یائسهٔ کم‌تحرک ۵۰ تا ٦۵ سال بود.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع مطالعات نیمه‌تجربی با دو گروه پیش و پس آزمون است که مراحل مربوط به اجرای آزمایشات در کمیتهٔ اخلاق در پژوهش‌های پزشکی و زیستی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با کد ir.umsu.rec.1394.453 تصویب و در شهریور ماه سال ۱۳۹٤در دانشگاه ارومیه انجام گردید.

جامعهٔ آماری این پژوهش را تمامی زنان یائسهٔ سالم و کم‌تحرک ۵۰ تا ٦۵ سال شهرستان ارومیه تشکیل دادند. طی فراخوان به‌عمل آمده، ۳۰۰ زن یائسه اعلام آمادگی کردند که از این میان ۲۰ آزمودنی واجد شرایط به صورت داوطلب و با روش نمونه‌گیری تصادفی به‌عنوان نمونه‌های این پژوهش انتخاب شدند. انتخاب آزمودنی‌ها با استفاده از تکنیک‌ها و روش‌های آماری به‌روش نمونه‌گیری تصادفی انجام گرفت.[۱۲]

معیارهای ورود شامل زنان یائسهٔ ۵۰ تا ٦۵ سال، حداقل داشتن دورهٔ یک سال یائسگی که برای اطمینان و کنترل بیشتر این امر سطوح نرمال یائسگی دو شاخص سرمی ۱۷ بتا استرادیول (µl/pg ٦۵-۱۱) و پروژسترون (µl/ng ۱-۰/۱) در آزمودنی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱)، کم‌تحرکی جسمانی، وضعیت جسمانی سالم و بدون مشکل خاص بالینی، بدون هیچگونه بیماری خاص در دستگاه‌های بدن و همچنین دستگاه اسکلتی-استخوانی مانند پوکی استخوان، بیماری‌های قلبی-عروقی، کم‌کاری یا پرکاری تیرویدی و پاراتیرویدی، نارسایی کلیوی، بیماری‌های تنفسی، آرتریت روماتویید، دیابت، بیماری‌های عصبی-روانی، بیماری‌های دستگاه تناسلی و غیره، بدون استفاده از هر داروی تاثیرگذار و یا داروهای بالینی، بدون هر گونه شکستگی استخوان و یا جراحی یک اندام/عضوی از بدن و در نهایت تاییدیه سالم و نرمال بودن تست تراکم استخوان بودند.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

معیارهای خروج آزمودنی‌ها نیز عبارتند از: شناسایی بیماری و یا هر گونه بیماری مزمن دستگاه‌های بدن در روند ۱۲ هفته پروتکل تمرینی، دارو درمانی و یا هر نوع عامل درمانی–دارویی که بر تراکم استخوان تاثیرگذار باشد، ادامه ندادن منظم پروتکل تمرینی پژوهش، رژیم‌درمانی برای کاهش و یا افزایش وزن، شکستگی و یا جراحی عضوی از بدن در طی ۱۲ هفته پروتکل تمرینی پژوهش).

پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی، ۲۰ زن یائسه به‌عنوان نمونهٔ نهایی انتخاب شده و به‌صورت تصادفی به دو گروه مساوی تمرین (۱۰ نفر) و کنترل (۱۰ نفر) تقسیم شدند. گروه تمرین در برنامه فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت متوسط ٦٥ تا ۷۰٪ بیشینه ضربان قلب تمرین بر روی تردمیل را به همراه گرم کردن در ابتدا و بازگشت به حالت اولیه فعال در انتهای این نوع شیوهٔ تمرینی Warm up-Walking & Jogging Moderate Intensity Exercise Program-Recovery (W-WJMIEP-R) به مدت ۱۲ هفته شرکت داشتند،[۱و٦] در حالی‌که گروه کنترل در هیچ برنامه تمرینی شرکت نکردند. وضعیت تندرستی آزمودنی‌ها نیز با پرسشنامه تندرستی و پزشکی–ورزشی هنجار شده[۱و٦] و همچنین دستگاه سنجش تراکم مواد معدنی استخوان Dual X-ray absorptiometry, DXA (Hologic Inc., Bedford, MA, USA) برای سالم بودن دستگاه اسکلتی (بافت استخوان) ارزیابی شد. متغیرهای زمینه‌ای مانند سن، قد و وزن آزمودنی‌ها به‌ترتیب با استفاده از مصاحبه، قدسنج دیجیتالی با دقت ۱ mm و ترازوی دیجیتالی (Beurer، Germany) با دقت g ۱۰۰ ارزیابی شدند. درصد چربی و شاخص توده بدن با دستگاه DXA و ضربان قلب با ضربان‌سنج دیجیتالی (Polar, Sweden) و فشارخون با فشارسنج دیجیتالی (WDF-BP001, Brisk, Germany) اندازه‌گیری شدند. نمونه‌های خونی پیش از ٢٤ ساعت هر نوع برنامه تمرینی از آزمودنی‌های دو گروه جمع‌آوری شد. در مرحله بعدی، نمونه‌های خونی ٢٤ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی از آزمودنی‌ها جمع‌آوری گردید. لازم به یادآوری است که سه روز پیش از خونگیری پیش و پس آزمون به همه آزمودنی‌ها غذای یکسانی داده شد. پیش از تمرین و ۱۲ هفته پس از تمرین نیز تراکم استخوانی آزمودنی‌ها با استفاده از روش DXA و برای اندازه‌گیری بیان ژن آلکالین فسفاتاز، سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز و کلسیم، هورمون پاراتیرویید با کیت (E140T15AP, Euroimmun, Germany)، ۱۷–بتا استرادیول/استروژن و پروژسترون به‌ترتیب با دستگاه‌های Real-time RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, USA)، Biochemical auto-analyzer, BT-1500 (Biotechnica Instruments, Rome, Italy) و ELISA reader (Stat Fax-4200 microplate reader, Awareness Technology, Inc., Palm City, FL, USA) ارزیابی شدند.

برای تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی از آزمون نوارگردان Graded exercise test (GXT)، Jorji و همکاران استفاده شد.[۱۳] گروه تمرین، برنامه فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت متوسط ٦٥ الی ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین را بر روی تردمیل انجام دادند که زمان هر جلسه تمرین ۵۰ تا ٦۰ دقیقه، سه جلسه در هفته و به مدت ۱۲ هفته در نوبت صبح (۱۰:۰۰– ۱۱:۳۰) اجرا شد.

هر جلسهٔ تمرینی نیز شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن، ۳۵ تا ٤٥ دقیقه تمرینات هوازی با شدت متوسط از جمله پیاده‌روی و دوی سبک و پنج دقیقه برای سرد کردن یا ریکاوری (برگشت به حالت اولیه فعال) بود،[۱و٦] به‌طوری‌که گروه تمرین اولین هفته را با ۵۰٪، دو هفته دوم را با ٦۰٪، چهار هفته سوم را با ٦٥٪ و پنج هفته آخر را با ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین بر روی تردمیل اجرا کردند.[۱و٦] گروه کنترل نیز طی ۱۲ هفته در این پژوهش، هیچ نوع فعالیت ورزشی منظمی نداشته و شیوه عادی زندگی خود را دنبال کردند.[۱و٦]

لازم به ذکر است که پیش از عمل خونگیری، فشارخون هر آزمودنی در هر دو مرحله خونگیری برای حفظ سلامتی فرد و جلوگیری از افت شدید فشارخون مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس خونگیری از هر دو گروه پژوهش شامل گروه تمرین و گروه کنترل در شرایط پایه و ٢٤ ساعت پس از انجام آخرین جلسه پروتکل تمرینی انجام شد. خونگیری توسط کارشناس آزمایشگاه پاتولوژی انجام گرفت.

عمل خونگیری از ورید بازویی به مقدار ۱۰ ml در دو لوله نمونه خون که حاوی لوله‌های سرمی و لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد Ethylenediaminetetra-acetic Acid (EDTA) بودند، انجام شد. نمونه‌های بدون ماده ضدانعقادی برای اندازه‌گیری سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید، کلسیم، استروژن و پروژسترون با سانتریفیوژ جداسازی شد تا برای تجزیه و تحلیل بعدی مورد استفاده قرار گیرد. از خون تام با ماده آغشته به EDTA نیز برای

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

استخراج RNA در بیان ژن‌های بتا اکتین و آلکالین فسفاتاز لنفوسیتی استفاده گردید. برای ارزیابی سطوح سرمی متغیرهای وابستهٔ پژوهش نیز با استفاده از سوزن‌های ونوجکت از ورید بازویی دست چپ آزمودنی‌ها در حالت نشسته بر روی صندلی و استراحت، ۵ ml نمونه خون در دو نوبت پیش و پس آزمون در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی به‌وسیلهٔ تکنسین آزمایشگاه گرفته شد. برای جداسازی سرم، نمونه‌های خونی پس از ۱۵ دقیقه لخته شدن در دمای اتاق، در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند و سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز، کلسیم و هورمون پاراتیرویید، استروژن و پروژسترون به‌ترتیب با دستگاه‌های اتومات شده استاندارد اتوآنالایزر به‌وسیله کیت‌های بیوشیمی (Pars Azmoon Inc., Tehran, Iran) و الایزا ریدر به‌وسیله کیت‌های الایزای (E140T15AP-DRG, Euroimmun, Germany)، (1561-DRG, Euroimmun, Germany) و (2633-DRG, Euroimmun, Germany) ارزیابی شدند.

در مرحله اول به مقدار ۱۰۰۰ µl از خون تام به میکروتیوب‌های ۲ ml RNase DNase Free ریخته شد و ۱۰۰۰ µl نیز محلول بافری لیز کننده سلولی به هر میکروتیوب اضافه شد. پس از میکس کردن، به مدت دو دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و لایه رویی برداشته شد تا زمانی که یک پلت سفید رنگ در داخل میکروتیوب ظاهر گردد.

پس از این مرحله به مقدار ۱۰۰۰ µl از محلول ایزولیشن RNA RNX-plus™ Reagent (Cinnaclon, Tehran, Iran) ایران به پلت اضافه شد و سپس بر اساس کاتالوگ این محلول، گام‌ها به‌ترتیب انجام شد که عبارتند از: ۱- حدود ۱۰ ثانیه ورتکس و قرار دادن در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، ۲- اضافه کردن ۲۰۰ µl کلوروفورم، ۳- میکس کردن به مدت ۱۰ الی ۱۵ ثانیه، ٤- قرار دادن بر روی یخ به مدت پنج دقیقه، ۵- سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ آرپی‌ام در دمای ٤ °C به مدت ۱۵ دقیقه، ٦- برداشتن فاز رویی میکروتیوب و انتقال آن به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری RNase DNase Free جدید و اضافه کردن حجم برابری از ایزوپروپانل، ۷- میکس کردن و قرار دادن بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه، ۸- سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ (آرپی‌ام) در دمای ٤ °C به مدت ۳۰ دقیقه، ۹- حذف مایع‌رویی و اضافه کردن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪، ورتکس پلت و سانتریفیوژ با دور آرپی‌ام ۸۰۰۰ در دمای ٤ °C به مدت ۱۰ دقیقه، ۱۰- حذف مایع‌رویی و خشک کردن پلت به مدت چندین دقیقه، ۱۱- میکس کردن پلت در ۵۰ µl دیپس واتر و سپس قرار دادن در حمام گرمای ٦۰-۵۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه. به این ترتیب RNA استخراج گردید و برای سنجش میزان غلظت و خلوص آن از دستگاه NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) استفاده شد که خلوص RNA به‌وسیلهٔ نسبت ۲٦۰/۲۸۰، ۲۳۰/۲۸۰ مورد تایید قرار گرفت یعنی طول موج مناسب برای اسیدهای نوکلئیک ۲٦۰ nm و برای پروتیین‌ها ۲۸۰ nm است و در نهایت میزان RNA برحسب ng/µl تعیین شد. پس از این مرحله، میکروتیوب‌های حاوی RNA جهت سنتز Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) در مراحل بعدی به یخچال ۷۰- °C انتقال یافتند.

در این مرحله از ژن مورد نظر به‌طور معکوس ترجمه و از روی قطعات RNA به قطعات cDNA می‌رسیم. برای هر نمونه ۱ µl از RNA را به میکروتیوب‌های مخصوص کیت سنتز cDNA (cDNA synthesis kit, Bioneer, Seoul, South Korea) اضافه کرده و با استفاده از دستگاه RT-PCR (Thermo E750, Belgium) بر اساس کاتالوگ کیت سنتز cDNA، آنیلینگ (Annealing) پرایمر اختصاصی هگزامر/dN6 با دمای ۱۵ °C به مدت یک دقیقه، مرحله سنتز cDNA با دمای ۵۰ °C به مدت ٦۰ دقیقه و مرحله غیر فعال‌سازی گرما با دمای ۹۵ °C به مدت پنج دقیقه، نمونه‌های cDNA ساخته شدند و بعد میکروتیوب‌ها به دمای ٤ °C به مدت ۳۰ دقیقه انتقال داده شد و در صورت نگهداری طولانی مدت نیز به محیط ۲۰- °C انتقال یافتند. پرایمرهای اختصاصی ژن آلکالین فسفاتاز و همچنین بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرانس با استفاده از نرم‌افزار Genscript (Piscataway, NJ, USA) طراحی شد و با استفاده از نرم‌افزارهای OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) ارزیابی شدند. سپس برای تهیه پرایمرها، پودرهای لیوفیلیزه آن‌ها از Bioneer, South Korea تهیه گردید. توالی پرایمرهای این دو ژن در جدول ۲ نشان داده شده است.

در این سیستم تشخیصی یک مادهٔ فلورسنت در طی واکنش متناسب با میزان محصولات هر سیکل آزاد شده و میزان فلورسنت آن به‌وسیله یک نمایانگر شناسایی و ثبت می‌گردد. بنابراین تکثیر در هر

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

زمان قابل مشاهده است. به‌عبارتی امکان مانیتورینگ لحظه به لحظه واکنش فراهم آمده و در هر سیکل امکان بررسی فرآیند تکثیر وجود دارد. برای اندازه‌گیری ژن آلکالین فسفاتاز و بتا اکتین لنفوسیتی از دستگاه Real-time RT-PCR استفاده شد.

واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ SYBR® Green (Fermentas GmbH, St. Leon Rot, Germany) انجام شد که با منحنی ذوب (Melting curve) برای هر دو گروه پژوهش در محدوده دمایی ۶۰ °C تا ۹۵ برای ارزیابی توالی اختصاصی ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرانس/ژن خدمتکار و ژن آلکالین فسفاتاز به‌همراه سیکل دمایی آن‌ها صورت گرفت (شکل ۱).

پروتکل دستگاه گرمایی برای ژن بتا اکتین به‌ترتیب پنج دقیقه در دمای ۹۵ °C، تکرار ۴۰ چرخه به‌مدت ۱۰ ثانیه با ۹۵ °C، دمای آنیلینگ (Annealing) ۶۰ °C به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله نهایی به مدت ۲۰ ثانیه با دمای ۷۲ °C بود و برای ژن آلکالین فسفاتاز به‌ترتیب پنج دقیقه در دمای ۹۵ °C، ۹۵ °C به‌مدت ۱۰ ثانیه، دمای آنیلینگ ۶۱ °C به‌مدت ۱۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه با تکرار ۴۰ چرخه اجرا شد. واکنش در حجم نهایی ۱۲ µl (۰/۴ لاندا پرایمرهای اختصاصی فروارد و ریورس، ۴/۶ لاندا دپس‌واتر، ۱ لاندا cDNA و ۶ لاندا مستر میکس سایبر گرین (Fermentas, Germany) و بر اساس مقادیر مورد نظر انجام شد. در نهایت میانگین اعداد سی‌تی حاصل از دستگاه گرمایی (نمونه‌های دابل‌کیت) بر حسب شیوه ۲ بتوان منهای دلتادلتا سی‌تی/ تغییرات در بیان ژن (Fold change)[۱۴] برای پیش و پس آزمون با در نظر گرفتن گروه کنترل به‌عنوان مبناء ارزیابی شد. هنگامی که تغییرات در بیان ژن کمتر از عدد یک بود، آنگاه کاهش بیان ژن هدف و اگر تغییرات در بیان ژن بیشتر از عدد یک بود، افزایش بیان ژن هدف را داریم.

برای اطمینان از محصولات دستگاه گرمایی ریل‌تایم آرتی پی‌سی‌آر، نمونه‌های بتا اکتین و آلکالین فسفاتاز برای وجود DNA بر روی ژل آگارز با الکتروفورز به نمایش گذاشته شد و سپس به‌وسیلهٔ دستگاه ژل‌داک با اشعهٔ فرابنفش تصویربرداری شد (شکل ۲). به‌منظور آزمون پیش‌فرض‌های پژوهش، ابتدا طبیعی بودن داده‌های حاصل از متغیرهای وابستهٔ پژوهش با استفاده از آزمون

جدول ۱: مقایسه همسانی زنان یائسهٔ کم‌تحرک در گروه تمرین و کنترل در شرایط پایه

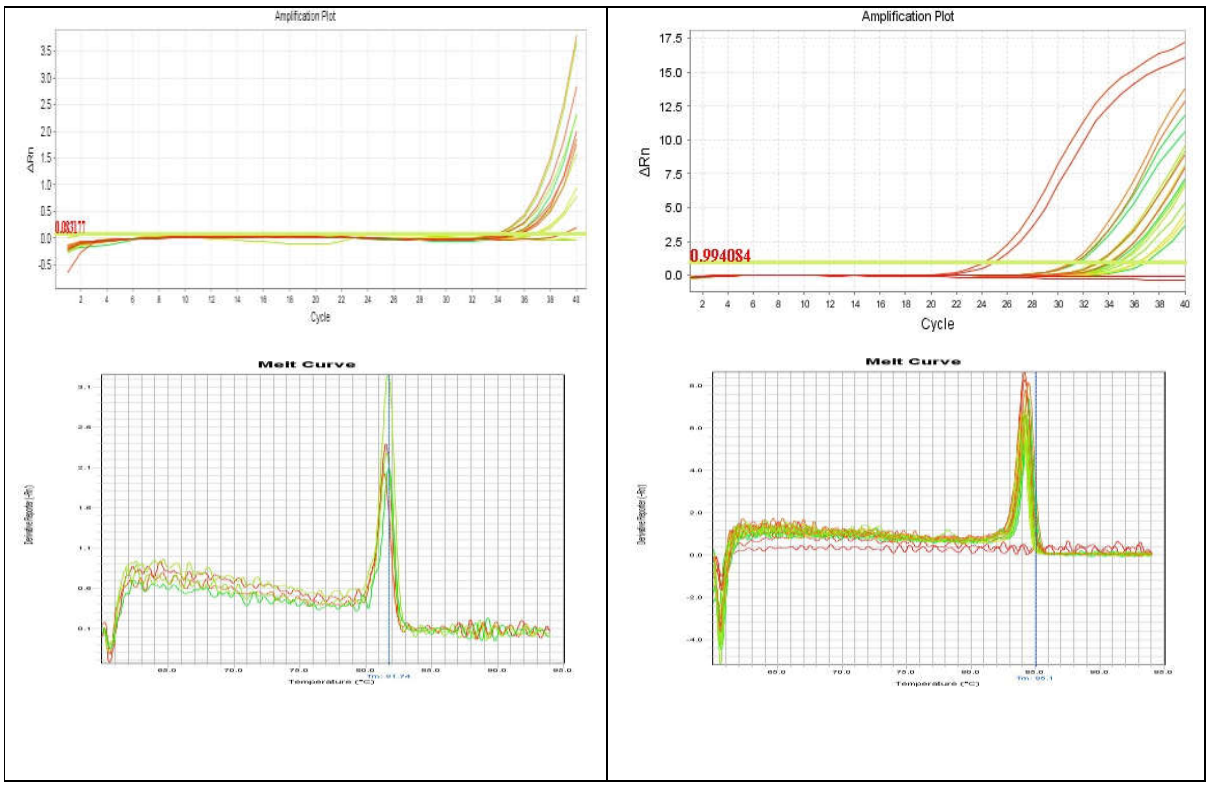
متغیر	گروه تمرین تعداد=۱۰	گروه کنترل تعداد=۱۰	تست لون	P	t مستقل	P
سن (سال)	۵۹/۰۰±۳/۵۷#	۶۲/۲۴±۴/۳۶	۱/۳۹۵	۰/۲۵۴	-۰/۲۲۳	۰/۸۲۶
قد (cm)	۱۵۵/۵۹±۶/۲۷	۱۵۸/۲۵±۶/۰۸	۰/۰۰۱	۰/۹۹۷	۰/۹۲۳	۰/۳۶۹
وزن (kg)	۷۳/۱۸±۱۰/۳۰	۷۱/۵۰±۱۰/۸۸	۰/۱۷۱	۰/۶۸۵	-۰/۳۴۳	۰/۷۳۶
مقادیر چربی (درصد)	۴۲/۰۳±۵/۱۰	۴۱/۷۰±۱/۵۱	۲/۴۹۵	۰/۱۴۰	-۰/۱۱۰	۰/۹۱۴
شاخص توده بدنی (kg/m^2)	۲۹/۶۸±۵/۱۷	۲۸/۵۶±۱/۷۰	۱/۴۶۵	۰/۲۴۳	-۰/۵۵۴	۰/۵۸۷
فشارخون سیستول (mmHg)	۱۱۳/۵۰±۱۱/۴۷	۱۱۱/۰۰±۸/۰۸	۳/۴۵۹	۰/۰۸۰	۰/۷۱۶	۰/۴۸۴
فشارخون دیاستول (mmHg)	۷۲/۷۰±۵/۷	۷۴/۰۰±۶/۲۴	۴/۷۶۸	۰/۰۵۲	۰/۷۶۳	۰/۴۵۶
ضربان قلب استراحت (ضربان/دقیقه)	۷۸/۹۰±۸/۲۷	۷۱/۳۳±۸/۵۰	۱/۱۲۳	۰/۳۰۴	-۱/۳۷۹	۰/۱۸۶
حداکثر اکسیژن مصرفی (mm/kg/min)	۳۹/۰۵±۲/۲۵	۳۹/۷۱±۱/۳۸	۰/۳۳۴	۰/۵۷۹	۱/۰۱۱	۰/۳۴۲
۱۷- بتا استرادیول (pg/µl)	۲۷/۳۲±۱۱/۰۴	۴۱/۱۷±۶/۸۳	۱/۲۳	۰/۲۹۲	۲/۲۲۱	۰/۰۵۳
پروژسترون (ng/µl)	۰/۲۰±۰/۱۰	۰/۳۵±۰/۱۹	۲/۷۲	۰/۱۳۰	۱/۷۷	۰/۱۰۶
T-score مهره‌های کمری	-۰/۰۰۹±۰/۹۵	-۰/۳۲۵±۰/۸۸	۰/۰۶۷	۰/۸۰۰	۰/۷۳۳	۰/۴۷۴
T-score گردن ران	-۰/۶۱۸±۰/۴۱	-۰/۱۸۷±۰/۹۷	۳/۷۶۰	۰/۰۵۴	-۱/۳۱۷	۰/۲۰۵

اعداد بر حسب میانگین و انحراف‌معیار استاندارد بیان شده‌اند. * تفاوت معنادار (P≤۰/۰۵). آزمون آماری: Independent sample t-test

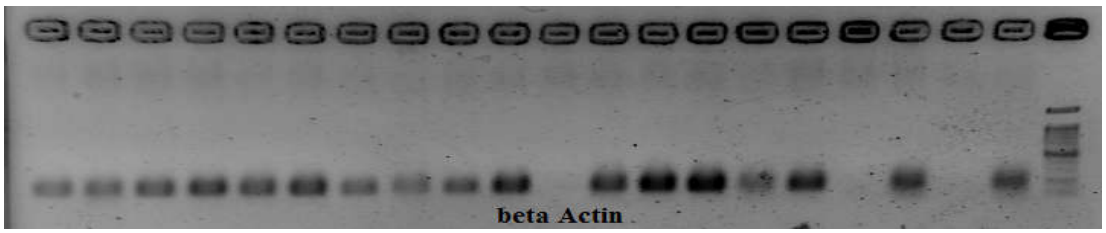
Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

جدول ۲: توالی پرایمرهای ژن آلکالین فسفاتاز (ALP) و بتااکتین (β-actin).

اسم ژن	توالی پرایمرها (3' → 5')	اندازهٔ محصول (bp)
β-actin forward	TGGACTTCGAGCAAGAGATG	۱۳۷
β-actin reverse	GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG	
ALP forward	TGAGAGTGACGAGAAAGCCA	۹۲
ALP reverse	GGGAGTGCTTGTATCTCGGT	



شکل ۱: سیکل دمایی و منحنی ذوب برای ژن بتا اکتین (سمت راست) و آلکالین فسفاتاز (سمت چپ) لنفوسیتی.



شکل ۲: نتایج ژل آگارز-ژل‌داک برای اطمینان از وجود DNA از محصولات دستگاه Real-time RT-PCR (ژن بتا اکتین، اندازه محصول bp ۱۳۷).

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. در مقایسه میانگین ویژگی‌های فیزیولوژیک دو گروه پژوهش در حالت پایه از Independent samples t-test استفاده شد.

سپس برای تعیین وجود تفاوت معنادار درون‌گروهی و بین‌گروهی پیش و پس آزمون به‌ترتیب از Paired samples t-test و ANCOVA استفاده شد که از تست شیب (Slope test) و همگنی واریانس‌ها (Homogeneity of variance /Levene's test) نیز برای پیش‌فرض‌های آن استفاده گردید. همهٔ آنالیز آماری به‌وسیله‌ی SPSS statistical software, version 23 (IBM, Armonk, NY, USA) در سطح معناداری ۵٪ انجام شد.

یافته‌ها

جدول ۱، همسانی گروه‌ها را نشان می‌دهد که از لحاظ فیزیولوژیکی دو گروه همگن هستند و تفاوت معناداری وجود ندارد (P>۰/۰۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید و کلسیم پس از ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی با شدت متوسط در درون‌گروهی تمرین و کنترل تفاوت معناداری نداشت (P>۰/۰۵)، ولی آلکالین فسفاتاز سرمی در هر دو گروه تفاوت معناداری داشت (P=۰/۰۰۱) (جدول ۳). نتایج بین‌گروهی نیز نشان داد که سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز و کلسیم

جدول ۳: مقایسه میانگین تغییرات درون‌گروهی پیش و پس آزمون ۱۲ هفته مداخله تمرینی در دو گروه پژوهش با استفاده از Paired Samples t-test.

آزمون آماری	پیش آزمون	پس آزمون	درجه آزادی	t همبسته	P
متغیر					
گروه تمرین					
ژن آلکالین فسفاتاز	#۱/۶۸±۱/۵۳	٤/۹٦±٤/٤۸	۹	-۱/۷۲۲	۰/۱۳٦
آلکالین فسفاتاز سرمی	۱۲۵/۱۸±۳٤/۷۰	۲۱۷/۲۷±٥٦/۸۳	۹	-۱۰/۹۸۲	*۰/۰۰۱
هورمون پاراتیرویید	۳۵/۳۲±۱٦/٥۹	٤۲/۱۱±۱٤/٥۸	۹	-۱/۲۷٦	۰/۲۳۱
کلسیم	۹/٤۳±۰/۳٥	۹/٤۲±۰/٤٥	۹	۰/۰٦	۰/۹٥۳
گروه کنترل					
ژن آلکالین فسفاتاز	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/٦٦۹±۰/٥۸	۹	۱/٥۰	۰/۱۸٤
آلکالین فسفاتاز سرمی	۱۱۸/٦٦±۲۸/٥٤	۲۰۸/٥۰±٤٥/۳٥	۹	-۸/٦۲۷	*۰/۰۰۱
هورمون پاراتیرویید	۲۲/٤۳±۲/۸٥	۱٥/۳۸±۷/۷۲	۹	۱/۹۹٥	۰/۱۰۳
کلسیم	۹/۲۸±۰/۲۸	۹/۳۸±۰/۹۱	۹	-۰/۲٥	۰/۸۰۹

اعداد بر حسب میانگین و انحراف‌استاندارد بیان شده‌اند. * تفاوت معنادار (P≤۰/۰۵). واحد ژن و سرم آلکالین فسفاتاز و کلسیم=Fold change و dl/mg، واحد هورمون پاراتیرویید=ml/ng.

جدول ٤: مقایسه میانگین تغییرات بین‌گروهی پیش و پس آزمون ۱۲ هفته تمرینات هوازی در دو گروه پژوهش با استفاده از آزمون ANCOVA.

آزمودنی	گروه تمرین/ تعداد=۱۰		گروه کنترل/تعداد=۱۰		تست لون	P	درجه آزادی	F یا آنکوا	P	ضریب Eta
متغیرها	پیش آزمون	پس آزمون	پیش‌آزمون	پس‌آزمون						
ژن آلکالین فسفاتاز	#۱/۶۸±۱/۵۳	٤/۹٦±٤/٤۸	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/٦٦۹±۰/٥۸	۱/۳۷۷	۰/۲٥٦	۱	٦/٥۰۱	*۰/۰۲۷	۰/۳۷۱
آلکالین فسفاتاز سرمی	۱۲٥/۱۸±۳٤/۷۰	۲۱۷/۲۷±٥٦/۸۳	۱۱۸/٦٦±۲۸/٥٤	۲۰۸/٥۰±٤٥/۳٥	۰/۰٥٤	۰/۸۱۹	۱	۰/۰۰٦	۰/۹٤۱	۰/۰۰۱
هورمون پاراتیرویید	۳٥/۳۲±۱٦/٥۹	٤۲/۱۱±۱٤/٥۸	۲۲/٤۳±۲/۸٥	۱٥/۳۸±۷/۷۲	۳/۳۱	۰/۰۸۹	۱	۱۰/٥۷	*۰/۰۰٦	۰/٤۳۰
کلسیم	۹/٤۳±۰/۳٥	۹/٤۲±۰/٤٥	۹/۲۸±۰/۲۸	۹/۳۸±۰/۹۱	۲/۱٤٦	۰/۱٦٤	۱	۰/۰۰	۰/۹۹۰	۰/۰۰۱

اعداد بر حسب میانگین و انحراف‌استاندارد بیان شده‌اند. * تفاوت معنادار (P≤۰/۰۵). واحد ژن و سرم آلکالین فسفاتاز و کلسیم=Fold change و dl/mg، واحد هورمون پاراتیرویید=ml/ng.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

تفاوت معناداری نداشت (به‌ترتیب P=۰/۹٤۱ و P=۰/۹۹۰)، در حالی‌که بیان ژن آلکالین فسفاتاز و هورمون پاراتیرویید تفاوت معناداری داشت (P≤۰/۰۵)، به‌طوری‌که هر دو متغیر وابسته در گروه تمرین افزایش و در گروه کنترل کاهش نشان داد. همچنین، ضرایب اِتا (Eta) نشـان می‌دهد که ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت متوسط ٦٥ الی ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین بر بیان ژن آلکالین‌فسفاتاز و هورمون پاراتیرویید به‌ترتیب ۳۷/۱٪ (افزایش چهار برابری) و ٤۳٪ تاثیر مثبت داشت (جدول ٤).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت متوسط ٦٥ الی ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین باعث افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و هورمون پاراتیرویید زنان یائسه کم‌تحرک ٥۰ تا ٦٥ سال می‌شود که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری وجود داشت (مشاهده ضرایب اِتا در جدول ٤)، ولی در سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز و کلسیم تفاوت معناداری بین دو گروه وجود نداشت.

همچنین نتایج درون‌گروهی حاصل از Paired sample t-test پژوهش حاضر نشان داد که ۱۲ هفته برنامه فعالیت ورزشی هوازی با شدت متوسط ٦٥ تا ۷۰٪ بیشینه ضربان قلب تمرین بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید و کلسیم در هر دو گروه تاثیر معناداری نداشت، ولی سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز در هر دو گروه افزایش معناداری را نشان داد. یافته‌های پژوهش حاضر با یافته‌های Tartibian و همکاران مبنی بر اینکه ۲٤ هفته تمرینات هوازی با شدت ٦٥٪ ضربان قلب بیشینه و سه جلسه در هفته و هر جلسه تمرین ٤٥ دقیقه باعث افزایش سطوح سرمی ۱ و ۲٥ ویتامین D، استروژن، استئوکلسین و تراکم استخوانی گردن ران در زنان یائسه ٥۸ تا ۷۸ سال می‌شود[٦].

Bagheri و همکاران مبنی بر اینکه هشت هفته فعالیت هوازی و قدرتی افزایش معناداری را در میزان هورمون پاراتیرویید سرمی در گروه‌های هوازی و قدرتی نسبت به گروه کنترل نشان داد[۸] و Tartibian و همکاران مبنی بر اینکه ۹ هفته تمرینات هوازی شدید با شدت ۷۰ تا ۸۰٪ حداکثر ضربان قلب برآوردی، سه جلسه در هفته و هر جلسه تمرین به مدت ۳۰ تا ٤٥ دقیقه باعث افزایش معنادار آلکالین فسفاتاز در زنان جوان ۲۷ سال می‌گردد[۱٥] همسو بوده و با یافته‌های Moazemi مبنی بر اینکه شش ماه تمرینات هوازی هیچ یک از شاخص‌های سرمی آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتیرویید، کلسیم و فسفر را تغییر نمی‌دهد[۹] و Malandish و همکاران مبنی بر اینکه ۱۲ هفته تمرینات هوازی با شدت متوسط ٦٥ تا ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین تراکم استخوانی و شاخص‌های سرمی استخوان را در زنان یائسه کم‌تحرک به‌طور معناداری تغییر نمی‌دهد،[۱] ناهمسو هستند. به‌عبارت دیگر، در مطالعه Tartibian و همکاران از لحاظ شدت و پروتکل تمرینی یعنی تمرینات هوازی با شدت ٦٥٪ ضربان قلب بیشینه و سه جلسه در هفته و هر جلسه تمرین ٤٥ دقیقه و همچنین از لحاظ نوع آزمودنی در مطالعه Tartibian و همکاران و Bagheri و همکاران به‌ترتیب زنان یائسه ٥۸ تا ۷۸ سال و زنان یائسه ٥٥ تا ۷۰ سال می‌تواند از علل احتمالی تشابهات با نتایج پژوهش حاضر باشد.[٦و۸] از علل اختلافات نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر پژوهش‌ها می‌توان به متفاوت بودن پروتکل طولانی مدت شش ماهه Moazemi و Jamali و همچنین سن آزمودنی‌ها اشاره کرد.[۸و۹و۱٥]

در پژوهش حاضر به‌نظر می‌رسد که شدت فعالیت ورزشی هوازی یعنی ٦٥ تا ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین پیاده‌روی و دوی سبک با سیگنالینگ سلولی بیان ژن آلکالین فسفاتاز و همچنین سطوح آلکالین فسفاتاز گردش خون همبستگی مثبت دارد، به‌طوری‌که افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز در گروه تمرین باعث تحریک سلول‌های استخوان‌ساز یعنی استئوبلاست‌ها شده است.[۱و٤]

به‌عبارت دیگر، فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت ٦٥ الی ۷۰٪ حداکثر ضربان قلب تمرین موجب انتقال فشارهای مکانیکی به درون سیگنالینگ سلولی بیوشیمیایی سلول‌های استئوبلاست شده[۱٦-۱۸] و در نتیجه بر اساس فرضیه انتقال فشارهای مکانیکی این احتمال وجود دارد که باعث افزایش کلسیم‌فسفات/ هیدروکسی آپاتیت و یا افزایش تراکم مواد معدنی استخوان در زنان یائسه کم‌تحرک شده است. از آن‌جا که استئوبلاست‌ها منشاء عظیمی از آلکالین فسفاتاز هستند، از این‌رو افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و همچنین سطوح سرمی آن نشانه‌ای از تحریک سلول‌های استئوبلاست بوده[٤] و در نتیجه سیگنالینگ سلولی در راستای افزایش تراکم مواد معدنی استخوان افزایش می‌یابد. همچنین ژن آلکالین فسفاتاز نقش

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

مهمی در سوخت و ساز فعال تامین فسفات غیر آلی آزاد با هیدرولیز اجزای فسفو بر عهده دارد.[۳] گزارش شده است که تغییر در ژن آلکالین فسفاتاز ممکن است تعیین کننده مهمی در کاهش استخوان ناشی از سن باشد و مسیر سوخت و ساز فسفات به‌عنوان یک هدف جدید در پیشگیری از پوکی استخوان محسوب می‌شود.[۳] در بافت‌های مینرالیزه نسبت فسفات به PPi به‌عنوان یک مهارکننده تشکیل کریستال‌های هیدروکسی‌آپاتیت مهم است.[۳] ژن آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در فرآیند مینرالیزاسیون بر عهده دارد و غلظت PPi برون‌سلولی با هیدرولیز PPi که یک مهار کننده تشکیل کریستال‌های هیدروکسی-آپاتیت است، تنظیم می‌کند[۱۹] که این امر در فرآیند مینرالیزاسیون استخوان مورد نیاز است[۲۰] و از این‌رو افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز در پژوهش حاضر می‌تواند نشانه‌ای از افزایش فرآیند مینرالیزاسیون استخوان ناشی از تشکیل کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت باشد.[۳] مسیرهای تنظیمی مهم کنترل‌کننده تمایزپذیری استئوبلاست و بیان ژن آلکالین فسفاتاز مربوط به سیستم BMP/RUNX2 (CBAf1, AML3)/ Osterix و آبشار سیگنالینگ WNT است.[۲۱و۲۲]

به‌تازگی در یک مطالعه‌ای گزارش شده است که در سیستم BMP/RUNX2 برخی از تولیدات ژنی مانند HOX10A که هم به‌عنوان تحریک‌کننده استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و هم تنظیم‌کننده مستقیم بیان ژن آلکالین فسفاتاز غیراختصاصی بافتی از طریق رمودلینگ کروموزومی است، دخیل هستند.[۲۳] همچنین، کنترل مضاعف بیان ژن آلکالین فسفاتاز از طریق عملکرد هورمون پاراتیرویید، ویتامین D و اسید رتینوییک (که از طریق مسیرهای منحصر به فردی بیان آلکالین فسفاتاز را میانجیگری می‌کنند) و تعامل با سیستم‌های تنظیمی مهم اعمال می‌شود.[۳۰-۲۴]

از طرفی، در پژوهش حاضر مشاهده شد که هورمون پاراتیرویید نیز در بین‌گروهی تفاوت معناداری داشت، به‌طوری‌که در گروه تمرین افزایش و در گروه کنترل کاهش یافته بود. از آن‌جا که سلول‌های استئوبلاست دارای گیرنده‌های هورمون پاراتیرویید هستند،[۱۶] از این‌رو این احتمال وجود دارد که افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز باعث تحریک گیرنده‌های هورمون پاراتیرویید شده و سطوح سرمی هورمون پاراتیرویید نیز افزایش یافته است که این امر احتمالاً با سیستم‌های تنظیمی مهم BMP/RUNX2 (CBAf1, AML3)/ Osterix و آبشار سیگنالینگ WNT در افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و تمایزپذیری استئوبلاست‌ها دخیل است.[۲۱و۲۲] با این حال، با توجه به یافته‌های مطالعات پیشین، اثرات دوگانگی هورمون پاراتیرویید بر افزایش و یا کاهش تشکیل استخوان در پرده ابهام باقی مانده است[۱۶و۱۷] و افزایش و یا کاهش آن به شدت تمرین، جنسیت، سطح فعالیت جسمانی نیز بستگی دارد.[۴] در پژوهش حاضر نشان داده شد که با افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و همچنین فعال شدن مسیر آبشار سلولی استئوبلاست‌ها در راستای افزایش مارکرهای تشکیل استخوان،[۴و۱۸] این احتمال وجود دارد که افزایش سطوح سرمی هورمون پاراتیرویید نشانه‌ای از افزایش تشکیل استخوان باشد.[۴و۱۶و۱۷] به‌نظر می‌رسد ثابت ماندن حد مطلوب سطوح سرمی کلسیم در این پژوهش ناشی از سازگاری‌های مثبت فعالیت ورزشی در طی ۱۲ هفته مداخله ورزشی در زنان یائسه است.[۱]

از مهمترین کاربردهای این پژوهش می‌توان به سازگاری‌های مثبت ناشی از فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک با افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و هورمون پاراتیرویید در زنان یائسهٔ کم‌تحرک اشاره کرد که این امر نشان‌دهنده تحریک سلول‌های استئوبلاست/ استخوان‌ساز بوده و ممکن است در پیشگیری از پوکی استخوان مفید باشد. همچنین، ارایه یک نسخه غیردارویی/ ورزشی متناسب با این رده سنی و جنسی در زنان یائسه می‌تواند در به حداقل رسانیدن فشارهای اقتصادی و نیز اطمینان‌بخش بودن تجویز و اثربخشی متغیر مستقل را در این گروه از آزمودنی‌ها به وجود بیاورد و قوت ببخشد.

از طرف دیگر، این اولین پژوهشی است که تاثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی پیاده‌روی و دوی سبک را به لحاظ سلولی و مولکولی و شناسایی مسیرهای سیگنالینگ افزایش تشکیل استخوان از جمله بیان ژن آلکالین فسفاتاز و اثر آن در معدنی شدن استخوان در نمونه‌های انسانی، به‌ویژه زنان یائسه مورد مطالعه قرار داده است. لذا، امید است که این پژوهش، راه‌گشایی برای مطالعات آتی در راستای تاثیر فعالیت ورزشی هوازی بر مسیرهای سیگالینگ سلولی افزایش تحریک سلول‌های استخوان‌ساز/ تراکم استخوان و شناسایی آن‌ها باشد.

بنابراین، با شناسایی ژن‌های درگیر در سلول‌های استخوانی در نمونه‌های انسانی می‌توان به نتایج دقیق‌تری در حیطه فیزیولوژی ورزشی سلولی و مولکولی پی برد. با این حال، برای اثبات این

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

مسیرهای سلولی و مولکولی نیاز به بررسی‌های بیشتری در این زمینه است.

بنابراین پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی، پروتکل تمرینی ۱۲ هفته‌ای فعالیت ورزشی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت بالاتری بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز در مسیرهای سیگنالینگ سلولی استخوان مورد بررسی قرار گیرد تا اثرات مثبت آن به اثبات برسد. همچنین، همین پروتکل تمرینی ۱۲ هفته‌ای فعالیت ورزشی پیاده‌روی و دوی سبک با شدت متوسط بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز در مسیرهای سیگنالینگ سلولی استخوان در مردان همتا مورد بررسی قرار گیرد تا تفاوت‌های جنسی نیز مشخص گردد.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه مقطع دکتری تحت عنوان تاثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی شدت متوسط بر بیان ژن و تراکم استخوانی در زنان سالم ۵۵ تا ۷۰ سال است که در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ در دانشگاه ارومیه به اتمام رسید.

References

1. Malandish A, Tartibian M, Rahmati-Yamchi M. Effect of 12 weeks of moderate-intensity aerobic exercise on bone density and serum indices of bone in sedentary postmenopausal women. *J Sport Phy*siol 2016;8(31):15-34. [Persian]
2. Plowman SA, Smith DL. Exercise Physiology for Health, Fitness, and Performance. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2014.
3. Sogabe N, Tanabe R, Haraikawa M, Maruoka Y, Orimo H, Hosoi T, et al. Associations between serum bone-specific alkaline phosphatase activity, biochemical parameters, and functional polymorphisms of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in a Japanese population. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013;22(1):160-5.
4. Sheikhlou Z, Tartibian B, Malandish A, Rahmati-Yamhi M. Effect of 12 weeks of moderate intensity aerobic exercise on hormonal markers and gene expression of alkaline phosphatase in postmenopausal women. 9th International Congress of Physical Education and Sport Sciences. Tehran: Shahid Beheshti University; 2016. [Persian]
5. Rahnama M, Lobacz M, Szyszkowska A, Trybek G, Kozicka-Czupcallo M. The effect of hormone replacement therapy on the expression of the alkaline phosphatase gene (ALPL) within the mucosal epithelium of the cheek and in peripheral blood lymphocytes. *Curr Issues Pharm Med Sci* 2014;27(2):92-6.
6. Tartibian B, Hajizadeh Maleki B, Kanaley J, Sadeghi K. Long-term aerobic exercise and omega-3 supplementation modulate osteoporosis through inflammatory mechanisms in post-menopausal women: a randomized, repeated measures study. *Nutr Metab (Lond)* 2011;8:71.
7. Gómez-Cabello A, González-Agüero A, Morales S, Ara I, Casajús JA, Vicente-Rodríguez G. Effects of a short-term whole body vibration intervention on bone mass and structure in elderly people. *J Sci Med Sport* 2014;17(2):160-4.
8. Bagheri L, Salami F, Rajabi H, Bagheri N. Effect of aerobic and strength training on serum PTH, calcium, albumin and alkaline phosphatase in postmenopausal women. *J Res Sports Med Technol* 2012;3(19):1-12.
9. Moazemi M, Jamali F S. The effect of 6-months aerobic exercises on bone-specific alkaline phosphatase and parathyroid hormone in obese inactive woman. *J Sport Biomotor Sci* 2014;5(2):71-9. [Persian]
10. Malandish A, Ebrahimi-Atri A, RashidLamir A, Ramezani M, Safarzadeh S. The comparison of bone density of lumbar spine and femoral neck between professional cyclists and non-athletes. *Res Sport Sci* 2010;2(8);61-72. [Persian]
11. Malandish A, EbrahimiAtri A, RashidLamir A. The comparison of bone mineral content (BMC) and bone area in professional Water polo players and non-athletes. *Int J Basic Sci Appl Res* 2013;2(6):569-73.
12. Delavar A. Research Methods in Psychology and Educational Sciences. 1st ed. Tehran: Nashre Virayesh Publishers; 2015. [Persian]
13. Tartibian B, Khorshidi M. Estimation of Physiological Indices in Exercise: Laboratory and Field. 1st ed. Tehran: Teimourzadeh Publication; 2006. [Persian]
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
15. Tartibian B, Tolouei-Azar J, Motabsaee N. The influence of nine-week intensive aerobic exercises; calcium and vitamin D supplementation on the metabolic response of bone formation biomarkers in young women. *Zahedan J Res Med Sci* 2011;8:47-54. [Persian]
16. Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* 2009;21(8):1245-54.
17. Weinstein RS, Jilka RL, Almeida M, Roberson PK, Manolagas SC. Intermittent parathyroid hormone administration counteracts the adverse effects of glucocorticoids on osteoblast and osteocyte viability, bone formation, and strength in mice. *Endocrinology* 2010;151(6):2641-9.
18. Rudberg A, Magnusson P, Larsson L, Joborn H. Serum isoforms of bone alkaline phosphatase increase during physical exercise in women. *Calcif Tissue Int* 2000;66(5):342-7.
19. Milan JL. Mammalian Alkaline Phosphatases. Weinheim, Germany: Wiley VCH Verlag GmbH and Co; 2006.
20. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(14):9445-9.
21. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005;280(39):33132-40.
22. Gaur T, Rich L, Lengner CJ, Hussain S, Trevant B, Ayers D, et al. Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. *J Cell Physiol* 2006;208(1):87-96.
23. Hassan MQ, Tare R, Lee SH, Mandeville M, Weiner B, Montecino M, et al. HOXA10 Controls osteoblastogenesis by directly activating bone regulatory and phenotypic genes. *Mol Cell Biol* 2007;27(9):3337-52.
24. Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Kato Y, Sato S, Kubota E, et al. Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D3-elicited differentiation of human osteoblastic

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

cells: roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix Biol* 2006;25(1):47-58.

25. Zhou YS, Liu YS, Tan JG. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin Med J (Engl)* 2006;119(15):1278-86.
26. Arriagada G, Paredes R, Olate J, van Wijnen A, Lian JB, Stein GS, et al. Phosphorylation at serine 208 of the 1alpha,25-dihydroxy Vitamin D3 receptor modulates the interaction with transcriptional coactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103(3-5):425-9.
27. Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Villagra A, Olate J, Zaidi K, et al. Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Biol* 2004;24(20):8847-61.
28. Wang BL, Dai CL, Quan JX, Zhu ZF, Zheng F, Zhang HX, et al. Parathyroid hormone regulates osterix and Runx2 mRNA expression predominantly through protein kinase A signaling in osteoblast-like cells. *J Endocrinol Invest* 2006;29(2):101-8.
29. Rey A, Manen D, Rizzoli R, Ferrari SL, Caverzasio J. Evidences for a role of p38 MAP kinase in the stimulation of alkaline phosphatase and matrix mineralization induced by parathyroid hormone in osteoblastic cells. *Bone* 2007;41(1):59-67.
30. Wang W, Xu J, Kirsch T. Annexin-mediated Ca2+ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278(6):3762-9.

TUMJ Tehran University Medical Journal, January 2017; Vol. 74, No. 10: 723-734 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:39 IRST on Monday December 16th 2019

Effect of moderate-intensity aerobic training on alkaline phosphatase gene expression and serum markers of bone turnover in sedentary postmenopausal women

Bakhtiar Tartibian Ph.D.[1]
Zeinab Sheikhlou M.Sc.[2*]
Abbas Malandish Ph.D.[2]
Mohammad Rahmati-Yamchi Ph.D.[3]
Rogayee Afsargarebag M.D.[4]

1- Department of Exercise Physiology, Department of Sport Injury and Corrective, School of Physical Education and Sport Sciences, Allameh Tabataba'i University, Tehran, Iran.
2- Department of Exercise Physiology, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Department of Clinical Biochemistry, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
4- Department of Interventional Cardiology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

*Corresponding author: No. 18, 8th Alley, Besaat-2 Ave., Urmia, Iran.
Tel: +98- 443- 2232236
E-mail: z.sheikhlou@gmail.com

Abstract

Received: 29 Apr. 2016 Revised: 13 Jan. 2017 Accepted: 18 Jan. 2017 Available online: 19 Jan. 2017

Background: Studies show that aerobic exercise prevents osteoporosis in menopause by stimulating osteoblastic cells. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of 12 weeks of moderate-intensity aerobic exercise on alkaline phosphatase gene expression, serum levels of alkaline phosphatase, parathyroid hormone, and calcium in sedentary women.

Methods: This investigation is a semi-experimental study that was performed in September 2015 at Urmia University, Iran. The statistical population was all healthy and sedentary postmenopausal women 50 to 65 years old in Urmia city. Twenty sedentary postmenopausal women with an average age 60.12±2.12 yr, weight 72.35±10.50 kg, and body mass index 29.46±3.24 kg/m^2 voluntarily and bona fide participated in this study, and then subjects were randomly divided to the Exercise/E (10 women) and Control/C (10 women) groups by random sampling method. E group performed of 12 weeks walking and jogging moderate-intensity aerobic exercise at 65-70% maximal heart rate of training, three sessions per week and per session 50-60 (min), but the C group participated in no intervention. Twenty-four hours before and after the 12-week training program were taken blood samples in order to measure of alkaline phosphatase gene expression and serum markers of bone in the E and C Groups. Evaluation of gene expression and serum markers of bone were measured by real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) and Auto-analyzer (Biotechnica, Italy)/ ELISA reader (Awareness Inc., USA) machines, respectively. Data analysis included descriptive and inferential (ANCOVA test) statistics using SPSS version 23 (Chicago, IL, USA) and a significance level of P≥0.05 was considered.

Results: The results showed that alkaline phosphatase gene expression and parathyroid hormone after 12 weeks of moderate-intensity aerobic exercise in between-groups were significantly increased (P=0.027 and P=0.006, respectively), while serum levels of calcium and alkaline phosphatase were not significantly different (P=0.941 and P=0.990, respectively).

Conclusion: The results suggest that 12 weeks of aerobic exercise of walking and jogging at 65-70% maximal heart rate of training increases alkaline phosphatase gene expression and parathyroid hormone in sedentary postmenopausal women.

Keywords: aerobic exercise, alkaline phosphatase gene expression, calcium, menopause, parathyroid hormone.