

اثر تمرینات مقاومتی و ترکیبی بر نشانگرهای بیوشیمیایی استخوان ساز و استحکام خمش استخوان ران رت های نر استئوپروتیک

فرزاد ناظم^۱، عباس صالحی^۲، کیا^۳، سید محمد مرندی^۴، سید جمال مشتاقیان^۴، آرشام رشید کابلی^۵

چکیده

زمینه و هدف: در مورد مداخله تمرین مقاومتی و ترکیبی بر پاسخ بیومکانیکی استخوان تحت شرایط پوکی استخوان، اطلاعات کمی در دست است؛ از این رو در مطالعه حاضر، اثر تمرین ترکیبی و مقاومتی بر نشانگرهای تشکیل استخوان و استحکام مکانیکی استخوان ران رت های نر استئوپروتیک مورد بررسی و مقایسه قرار می گیرد. **روش تحقیق:** از بین ۴۰ رت نر ویستار، ۸ رت به عنوان گروه سالم جدا شدند، سپس پوکی استخوان با تزریق صفاقی محلول ۲۰٪ اتانول طی ۳ هفته در سایر رت ها القاء گردید. رت های استئوپروتیک به ۴ گروه پایه، مقاومتی، ترکیبی و کنترل تقسیم شدند. تمرین مقاومتی شامل ۸ نوبت صعود از نردبان عمودی همراه حمل وزنه بود. گروه ترکیبی هر دو برنامه تمرین مقاومتی و استقامتی (۶۰ دقیقه در روز با سرعت ۱۲ متر در دقیقه) را انجام دادند. پس از تکمیل ۱۲ هفته تمرین با تکرار ۵ روز در هفته، نمونه های خونی جمع آوری و غلظت استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز ویژه استخوان با روش الیزا اندازه گیری شدند. استخوان ران چپ خارج شده نیز به وسیله تست خمشی سه نقطه ای، برای به دست آوردن حداکثر نیرو و سفتی مورد آزمایش قرار گرفت. داده ها با آزمون تحلیل واریانس یک سوپیه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی داری ۰/۰۵، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. **یافته ها:** دو گروه مقاومتی و ترکیبی، افزایش معنی داری در تمامی شاخص های اندازه گیری شده نشان دادند ($p < 0/05$). در مقایسه با تمرین مقاومتی، تمرین ترکیبی بر آلکالین فسفاتاز سرم ($p = 0/04$) و استحکام مکانیکی استخوان ($p = 0/0001$)، تاثیر معنی دارتری داشت. **نتیجه گیری:** احتمالاً تمرین ترکیبی در مقایسه با تمرین مقاومتی، حمایت بیشتری در برابر پوکی استخوان ایجاد می کند.

واژه های کلیدی: ورزش، نشانگرهای تشکیل استخوان، استحکام مکانیکی، پوکی استخوان.

۱. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۲. نویسنده مسئول، استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران؛ آدرس: زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی؛ پست الکترونیک: salehikia@ped.usb.ac.ir
۳. استاد گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۴. استادیار گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۵. کارشناس ارشد زیست جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

مقدمه

و ساخت استخوان را منعکس می کنند و در ارزیابی و کنترل پوکی استخوان نقش دارند (سیبل، ۲۰۰۵). از سوی دیگر، دلیل عمده شکستگی های استئوپروتیک که در اثر برخوردهای جزئی و حداقل ضربه مکانیکی و گاهی حتی خود به خودی رخ می دهد، تحلیل رفتگی کیفیت استخوان و کاهش استحکام مکانیکی آن برشمرده شده است (بک^۱ و دیگران، ۲۰۱۱). به دلیل آن که ارزیابی قدرت و استحکام استخوانی در نمونه های انسانی مقدور نیست، اکثر پیشینه های علمی روی انسان، بر تراکم سنجی بافت استخوان متمرکز شده اند. این در حالی است که در مدل های حیوانی و با انجام آزمون های مستقیم بیومکانیکی روی استخوان، می توان به شناخت بهتری از خواص مکانیکی استخوان در برابر سایر روش های یاد شده، دست یافت. خصوصیات مکانیکی استخوان، به عنوان عامل اصلی در ارزیابی ساختار و عملکرد استخوان معرفی شده که با نسبت مواد و اجزاء تشکیل دهنده اصلی استخوان (هیدروکسی آپاتیت^۹ و کلاژن)، جنس مواد تشکیل دهنده، شکل و اندازه استخوان (ژئومتری)^{۱۰} و ریز ساختارهای بافت تراکولار^{۱۱} و کورتیکال^{۱۲}، رابطه دارد و به وسیله یک آزمون بیومکانیکی قابل اندازه گیری می باشد (چن^{۱۳} و دیگران، ۲۰۰۴). این خصوصیات ممکن است به طور مستقل و حتی بدون تغییر معنی دار تراکم استخوانی در کاهش یا افزایش خطر وقوع شکستگی نقش داشته باشند (هلدر^{۱۴} و دیگران، ۲۰۱۳). تاثیر تمرینات ورزشی با تحمل وزن بر بافت اسکلتی به وسیله ارزیابی استحکام مکانیکی و اندازه گیری شاخص های متابولیسم استخوان، به ویژه عوامل تشکیل استخوان، در گزارش های علمی روی حیوانات آزمایشگاهی بررسی شده است. در این زمینه، شواهد علمی از افزایش ناپایدار نشانگرهای استئوپروتیک متعاقب ۸ هفته ورزش مقاومتی در رت های نر عقیم شده (ناتومی^{۱۵} و دیگران، ۲۰۰۲)، افزایش استئوکلسین رت های ماده استئوپروتیک شده پس از ۱۲ هفته تمرین

پوکی استخوان، شایع ترین اختلال در متابولیسم و مواد معدنی استخوان است که معمولاً با کاهش تراکم توده استخوانی و از دست رفتن کیفیت ریز ساختار آن همراه می باشد و به شکنندگی بیشتر و خطر وقوع شکستگی استخوان می انجامد (لی^۱ و دیگران، ۲۰۱۴). فرآیند بازسازی استخوان به طور چشمگیر توسط فشارهای مکانیکی وارد بر بافت استخوان، تحت تاثیر قرار می گیرد (فونگ^۲ و دیگران، ۲۰۱۲). از سوی دیگر، فشارهای مکانیکی ناشی از فعالیت های ورزشی از مهم ترین عواملی هستند که موجب رشد و گسترش بافت اسکلتی می شوند. با این حال، مکانیسم هایی که توسط آن متابولیسم استخوان تحت تاثیر فعالیت بدنی قرار می گیرد، هنوز کاملاً شناخته نشده است. بر پایه شواهد علمی، نشانگرهای بیوشیمیایی متابولیسم استخوان که معرف فعالیت های سلولی بازجذب و تشکیل استخوان هستند، ابزار مفیدی برای نمایش اثرات حاد و طولانی فعالیت بدنی بر فرآیند بازسازی استخوان به شمار می روند، تغییرات دینامیکی عملکرد استخوان را ارزیابی کرده و در نهایت، پاسخ متابولیسم استخوان به فعالیت بدنی را تعیین می کنند (مایمون^۳ و سالتن، ۲۰۱۱). این نشانگرها، شاخص های برجسته ای هستند که تغییرات نامطلوب سوخت و ساز استخوان را زودتر از زمانی که هنوز آسیب ساختاری رخ نداده است، نشان می دهند. در حالی که تکنیک هایی مانند بافت شناسی، توموگرافی (MCT)^۴، تراکم سنجی یا پرتونگاری ایکس، همگی به نقاط آناتومیکی خاصی در استخوان محدود می شوند، این نشانگرها یک برآورد کلی از سوخت و ساز استخوان را در کل ارگانیسم در اختیار پژوهشگر قرار می دهند که با توجه به ماهیت سیستمیک پوکی استخوان، یک مزیت محسوب می شود. در این میان، آلکالین فسفاتاز^۵ ویژه استخوان و استئوکلسین^۶، از مهم ترین نشانگرهای استئوپورتیک^۷ هستند که جنبه های گوناگون عملکرد استئوبلاست ها

1. Li

2. Foong

3. Maimoun and Sultan

4. Micro computed tomography

5. Alkaline phosphatase

6. Osteocalcin

7. Osteoporotic

8. Beck

9. Hydroxyapatite [Ca5(PO4)3(OH)]

10. Geometry

11. Trabecular

12. Cortical

13. Chen

14. Helder

15. Notomi

و بهینه که ممکن است پتانسیل بیشتری در مسیر پیشگیری و درمان نسبی پوکی استخوان داشته باشد، مفید خواهد بود. در باره تغییرات اسکلتی و سازگاری های حاصل از تأثیر تمرینات ترکیبی (استقامتی - مقاومتی) در فرآیند پوکی استخوان، اطلاعات زیادی در دسترس نیست. ممکن است سازگاری های ناشی از اجرای تمرینات ترکیبی (دیسوزا^۱ و دیگران، ۲۰۱۳)، تأثیر بهتری بر استحکام و قدرت استخوان در مقایسه با هر یک از الگوهای تمرینات مقاومتی یا استقامتی به تنهایی داشته باشد. به همین منظور، مطالعه حاضر با تحلیل شاخص های بیومکانیکی حداکثر نیروی شکست و سفتی استخوان به روش مکانیکی استحکام خمشی استخوان و نیز ارزیابی نشانگرهای بیوشیمیایی استئوپروتیک، بازتابی از رفتار مکانیکی استخوان استئوپروتیک به دنبال مداخله دو نوع تمرین ورزشی مقاومتی و ترکیبی را بررسی می کند.

روش تحقیق

طرح آزمایش: تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه وزنی ۲۰۰-۱۸۰ گرم از مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) خریداری شد و به حیوان خانه گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان منتقل گردید. رت ها در گروه های ۴ تایی در قفس های پلی کربنات شفاف و در محیط کنترل شده با دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد و رطوبت 55 ± 3 درصد با چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. برای تغذیه روزانه رت ها از غذای استاندارد به شکل پلت ساخت شرکت به پرور استفاده شد. پس از دو هفته نگهداری حیوانات جهت سازگاری با محیط، ۸ سر رت به عنوان گروه سالم برای تعیین اندازه طبیعی عوامل ارزیابی بافت استخوانی به طور تصادفی انتخاب شدند و سایر رت ها برای القاء پوکی استخوان، با تزریق صفاقی محلول ۲۰% اتانول/سالین با دوز ۳ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، یک نوبت در روز به مدت ۴ روز

ورزشی با شدت فزاینده در برابر گروه سالم کم تحرک و کاهش آن در برابر رت های کنترل استئوپروتیک (لی و دیگران، ۲۰۱۴)، یا عدم تغییر غلظت آکالین فسفاتاز و استئوکلسین سرم متعاقب انجام دو پروتکل تمرین مقاومتی با بار فزاینده در دو مطالعه جداگانه بر روی رت های نر (۸ هفته تمرین) (کوالیه^۱ و دیگران، ۲۰۰۳) و رت های ماده (۱۰ هفته تمرین) (فونگ و دیگران، ۲۰۱۲) حکایت دارد. در ارزیابی های استحکام مکانیکی نیز ناتومی و دیگران (۲۰۰۲) نشان دادند که فعالیت مقاومتی از تخریب بافت استخوانی ران در رت های نر عقیم شده جلوگیری نموده، استحکام مکانیکی و تراکم توده استخوانی کورتیکال را از طریق تحریک تشکیل استخوان پریوستئال^۲ حفظ می کند. در همین راستا، رنو^۳ و دیگران (۲۰۰۷) با اجرای یک برنامه تمرین مقاومتی با بار فزاینده، افزایش در قدرت و سایر خصوصیات فیزیکی استخوان را گزارش کردند. در مطالعه دراموند^۴ و دیگران (۲۰۱۳) نیز تمرین مقاومتی با وزنه، خواص مکانیکی استخوان ران موش های نر بالغ را افزایش داد، اما تغییر معنی داری در حجم و تراکم ماده معدنی استخوان (BMD) مشاهده نشد.

در باره ویژگی شدت تمرین برای دست یابی به حداقل سازگاری در خواص فیزیکی و استحکام مکانیکی استخوان، گزارش های ناهمسوئی وجود دارد (فونگ و دیگران، ۲۰۱۲) و مشخص نیست آیا به کمک نشانگرهای بیوشیمیایی استخوان، قادر خواهیم بود تغییرات بیومکانیکی بافت استخوان را طی الگوهای متفاوت برنامه تمرینی، تعیین نماییم. هر چند شواهد علمی نشان از آن دارند که تمرین مقاومتی در نقش یک محرک کارآمد، برای افزایش دادن پاسخ های استئوژنیک^۵ استخوان عمل می کند (لستر^۶ و دیگران، ۲۰۰۹؛ مولتانی^۷ و دیگران، ۲۰۱۱)؛ هنوز نتایج متناقضی توسط پژوهشگران گزارش می شود (دراموند و دیگران، ۲۰۱۳). برای درک بهتر پاسخ های سازگاری ورزش، استفاده از آزمون های مکانیکی به عنوان یک روش تهاجمی عینی در شناسایی یک شیوه تمرینی خاص

1. Cavalie
2. Periosteal
3. Renno
4. Drummond

5. Osteogenic
6. Lester
7. Multani
8. De Souza

آشنا سازی، برنامه اصلی شامل ۸ نوبت بالارفتن در ۸ تا ۱۲ تکرار با اضافه بار فزاینده اجرا گردید. در نوبت های اول و دوم، وزنه ای معادل ۵۰٪ وزن بدن به دم رت بسته شد. سپس اضافه بار ۷۵٪ برای نوبت های سوم و چهارم و ۹۰٪ برای نوبت های پنجم و ششم و سرانجام ۱۰۰٪ وزن حیوان برای نوبت های هفتم و هشتم، اعمال گردید (کاسیل هاس^۴ و دیگران، ۲۰۱۳). در فاصله زمانی هر دو نوبت، رت ها ۶۰ ثانیه در جعبه فوقانی تعیبه شده هم طراز محل بالای نردبان، استراحت کردند. در همین فاصله، وزنه ها توسط نوار چسب به دم رت نزدیک به تنه بسته شد. برنامه تمرینی مقاومتی، ۵ جلسه در هفته صبح ها و به مدت ۱۲ هفته اجرا گردید.

برنامه تمرین ترکیبی: تمرین ترکیبی شامل تمرین مقاومتی (شرح داده شده در بالا) و تمرین استقامتی شامل دویدن روی نوارگردان ۶ کاناله (ساخت ایران، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان) بود. یک هفته پس از مرحله آشناسازی، پروتکل اصلی شامل دویدن روی نوار گردان با شیب صفر درجه و با سرعت ثابت ۱۲ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در جلسه اول و تا حداکثر ۶۴ دقیقه در جلسات پایانی اجرا گردید (جدول ۱) (ایواماتو^۵ و دیگران، ۲۰۰۵). گروه تمرین ترکیبی نیز ۵ روز در هفته به مدت ۱۲ هفته تمرین کردند، به طوری که نخست تمرین مقاومتی و بلافاصله پس از آن، تمرین استقامتی را اجرا نمودند. تمرین مقاومتی همواره پیش از تمرین استقامتی اجرا شد تا از خستگی زودرس ناشی از تمرین استقامتی، جلوگیری شود (حسینی و دیگران، ۲۰۰۸).

پیاپی تا ۳ هفته، قرار گرفتند (کالاسی^۱ و دیگران، ۲۰۰۴؛ شناوی^۲ و دیگران، ۲۰۱۳). پس از ۳ هفته تزریق الکل، رت های استئوپروتیک به صورت تصادفی در چهار گروه شامل گروه های پایه، مقاومتی، ترکیبی و کنترل (هر گروه ۸ سر رت) تفکیک شدند و عامل مداخله به مدت ۱۲ هفته اعمال گردید. تقویت های منفی مانند شوک الکتریکی، پمپ فشار باد و غیره، در طول اجرای پروژه استفاده نشد. در همسان سازی استرس احتمالی حیوان ناشی از مواجهه با آزمونگر، گروه کنترل، روزانه و در زمان معینی، برای وزن کشی جابجا و لمس می شدند. همچنین برای همگن نمودن وزن رت ها جهت مهار اثرات احتمالی آن بر متغیرهای وابسته، گروه های مداخله و کنترل، میزان خوراک مصرف شده توسط گروه تمرین ترکیبی در روز قبل را دریافت می نمودند (جو^۳ و دیگران، ۲۰۰۳). بدین ترتیب، غذای مصرفی روزانه گروه ترکیبی قبل از شروع ورزش اندازه گیری و به همان اندازه در اختیار سایر گروه ها قرار گرفت. دسترسی به آب برای همه رت ها آزاد بود. وزن کشی هر سه گروه به طور روزانه انجام گرفت. دو گروه سالم و پایه به ترتیب برای مطالعه اندازه های طبیعی و شرایط پوکی استخوان، قبل از مداخله تمرینی، کشته شدند. نتایج این دو گروه برای مشخص شدن رخداد پوکی استخوان در رت های تحت آزمایش مقایسه گردید. دو گروه تمرین مقاومتی و ترکیبی نیز به همراه گروه کنترل در پایان پروژه (۱۲ هفته) کشته شدند. مراحل این مطالعه بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق و گروه فیزیولوژی دانشگاه اصفهان بر روی حیوانات آزمایشگاهی تأیید و اجرا شد.

برنامه تمرین مقاومتی: این پروتکل شامل بالارفتن از یک نردبان با طول ۱۱۰ و عرض ۳۵ سانتیمتر و شیب ۸۰ درجه نسبت به سطح افق بود. در بالای نردبان یک جعبه برای استراحت حیوان در فواصل میان نوبت ها، تعیبه گردید. یک هفته پس از مرحله

جدول ۱. پروتکل تمرین استقامتی (ایواماتو، ۲۰۰۵)

هفته ها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
زمان (دقیقه)	۱۰	۱۶	۲۲	۲۸	۳۴	۴۰	۴۶	۵۲	۵۸	۶۴	۶۴	۶۴
سرعت (متر/دقیقه)	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲

بر لیتر انجام گرفت. خوانش یافته های کیت الایزا توسط دستگاه خوانشگر الایزا مدل Stat Fax از کمپانی Awareness کشور آمریکا انجام گرفت.

ارزیابی استحکام مکانیکی استخوان: قبل از انجام تکنیک آزمون خمشی سه نقطه ای^۱، نمونه های استخوان ران از فریزر خارج شدند و ۳ ساعت در دمای استاندارد اتاق نگهداری گردیدند؛ سپس تا پایان آزمون برای جلوگیری از دهیدراته شدن، مرتب با سرم فیزیولوژیک ۹% مرطوب شدند (درموند و دیگران، ۲۰۱۳). سنجش استحکام مکانیکی استخوان با دستگاه ارزیابی مقاومت استخوان (Zwick Z ۵/۲ ساخت کشور آلمان) روی استخوان ران چپ همه رت ها انجام گرفت. طرز انجام این آزمون چنین بود که پس از انتخاب شاخص های مربوط به انجام آزمون در نرم افزار دستگاه، فک های دستگاه متناسب با آزمون خمشی سه نقطه ای تنظیم گردید. پس از خروج نمونه استخوانی از داخل سرم فیزیولوژیک، بلافاصله روی دو تکیه گاه فلزی به صورت قدامی- خلفی روی فک های پایینی دستگاه قرار گرفت. سپس فک بالا به صورت عمودی بر محور طولی استخوان با سرعت ثابت ۵ میلی متر بر دقیقه حرکت کرد. برای اطمینان از یکپارچگی نقاط اعمال نیرو در همه نمونه های استخوان ران، با استقرار در دهانه کولیس روی سر دور از تنه (دیستال) و نزدیک به تنه (پروگزیمال) استخوان، نمونه استخوانی به گونه ای روی پایه های دستگاه جای گرفت که نقطه اثر نیروی دستگاه، درست

خون گیری و تهیه نمونه های استخوانی: برای تهیه

نمونه ها از بافت های خون و استخوان گروه های تجربی و کنترل، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و متعاقب ۱۲ ساعت ناشتا، هر رت به مدت ۲-۳ دقیقه در ظرف دسیکاتور حاوی ۵ میلی لیتر اتر بیهوش گردید. سپس قفسه سینه حیوان شکافته و نمونه خون مستقیم از قلب حیوان گرفته شد. نمونه های خون پس از سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه، ۳۰۰۰ دور در دقیقه) و جدا سازی سرم برای سنجش عوامل منتخب بیوشیمیایی در دمای ۸۰- (فونگ و دیگران، ۲۰۱۲). پس از کشته شدن رت ها، استخوان ران چپ حیوان از بخش های لگن و زانو جدا گردید. سپس بافت های نرم اطراف استخوان با دقت و بدون آسیب دیدگی ضریع، جداسازی شد و بلافاصله برای جلوگیری از دهیدراته شدن، درون گاز آغشته به سرم فیزیولوژیک ۹% بانداژ گردید و در دمای ۲۰- درجه تا زمان فرارسیدن آزمون، فریز شد (درموند و دیگران، ۲۰۱۳).

ارزیابی نشانگرهای بیوشیمیایی: اندازه گیری

استئوکلسین سرم به روش الایزا و به وسیله کیت EIA-۲۰۹۵ از کمپانی DRG کشور آمریکا با ضریب تغییرات درون گروهی ۱/۸ و بین گروهی ۲/۷ با حساسیت ۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر و ایزوآنزیم آلکالین فسفاتاز ویژه استخوان با استفاده از کیت کمپانی Biotech ساخت کشور چین با ضریب تغییرات درون گروهی ۱/۵ و بین گروهی ۱/۰۳ درصد با حساسیت ۳/۹ واحد بین المللی

یافته ها

بین وزن اولیه همه گروه های تحت مطالعه و وزن نهایی سه گروه تجربی، تفاوت معنی داری به لحاظ آماری مشاهده نگردید ($p=0/55$ و $p=0/08$) (جدول ۲). نتایج آزمون استحکام خمشی سه نقطه ای پس از ۱۲ هفته تمرین، افزایش معنی داری را در شاخص حداکثر نیروی شکست تنه استخوان ران رت های گروه مقاومتی ($p=0/001$) و گروه ترکیبی ($p=0/001$) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد، اما این شاخص بیومکانیکی در گروه تمرین ترکیبی به طور معنی داری بالاتر از گروه تمرین مقاومتی بود ($p=0/01$). شاخص مکانیکی سفتی استخوان نیز افزایش معنی داری در هر دو گروه تمرین مقاومتی ($p=0/009$) و ترکیبی ($p=0/001$) در برابر گروه کنترل داشت؛ در حالی که این شاخص گرایش بیشتری به سمت گروه تمرین ترکیبی نشان داد ($p=0/02$) (جدول ۲). روش تحلیل واریانس همچنین نشان داد که میزان سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز ویژه استخوان و استئوکلسین به ترتیب در هر دو گروه مقاومتی

در نقطه میانی شافت استخوان، وارد شود. برای جلوگیری از سر خوردن احتمالی زیر دو سر استخوان، از کاغذ سمباده استفاده گردید. بار اعمال شده هنگام گسیختگی بافت استخوانی و منحنی نیرو - جابجایی به طور خودکار توسط نرم افزار دستگاه ترسیم شد و در مانیتور کامپیوتر متصل به دستگاه، ثبت گردید. سپس شاخص های مکانیکی شامل حداکثر نیروی شکست^۱ بر حسب نیوتن و سفتی^۲ بر حسب نیوتن بر میلی متر، با نرم افزار Test Txpert برای هر نمونه استخوانی تعیین گردید (ناتومی و دیگران، ۲۰۰۲).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها: نرم افزار SPSS20 برای تحلیل داده ها به کار گرفته شد. از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف^۳ و لون^۴ به ترتیب برای واریانس توزیع طبیعی داده ها و همگونی احتمالی واریانس ها، استفاده گردید. برای مطالعه تغییرات میان گروهی از روش تحلیل واریانس یک سوپیه^۵ و در صورت تفاوت احتمالی، آزمون تعقیبی LSD با پیش فرض رعایت سطح معنی داری $p < 0/05$ مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲: تغییرات حداکثر نیروی شکست و سفتی استخوان ران رت های نر استئوپروتیک (میانگین و انحراف معیار)

استحکام مکانیکی (آزمون خمشی سه نقطه)		وزن حیوان (گرم)		گروه ها
سفتی استخوان (نیوتن بر میلی متر)	حداکثر نیروی شکست (نیوتن)	پس آزمون	پایه	
۱۹۳/۰۹±۸/۷۴	۱۲۹/۰۶±۱۷/۵۶	-	۲۵۸/۷۵±۸/۶۱	سالم
۱۰۲/۲۸±۶/۵۲ †	۷۳/۷۷±۶/۱۲ †	-	۲۴۸/۵±۱۲/۷۲	پیش آزمون
۱۰۴/۳۲±۱۱/۳۳	۸۶/۵۱±۲/۶۰	۴۰۷/۱۲±۸/۰۲	۲۵۱/۵±۱۶/۰۸	کنترل
۱۲۷/۲۶±۱۰/۷۴ ◊	۱۰۱/۷۶±۱/۴۵ ◊	۴۰۳/۲۵±۱۱/۱۴	۲۴۸/۸۸±۱۴/۲۶	مقاومتی
۱۴۷/۰۷±۱۷/۹ ◊*	۱۱۵/۵۵±۷/۸۲ ◊*	۳۹۸/۱۲±۱۴/۹۶	۲۵۴±۱۴/۶۶	ترکیبی

†: نشانه اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه سالم ◊: نشانه اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل. *: نشانه اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه مقاومتی، در سطح $p < 0/05$.

1. Maximum breaking-force
2. Stiffness
3. Kolmogorov-Smirnov test

4. Leven
5. Test of homogeneity of variances
6. One-way ANOVA

حالی است که شاخص دامنه تغییر آلکالین فسفاتاز ویژه استخوان ران، تمایل به سوی گروه ترکیبی داشت ($p=0/001$) (جدول ۳).

($p=0/001$ ، $p=0/001$) و ترکیبی ($p=0/001$ ، $p=0/001$) به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل است، اما در میزان استئوکلسین دو گروه تمرین مقاومتی و ترکیبی، تفاوت معنی داری به دست نیامد ($p=0/07$)؛ این در

جدول ۳: تغییرات آلکالین فسفاتاز ویژه استخوان، استئوکلسین رت های نر استئوپروتیک (میانگین و انحراف معیار)

نشانه‌های بیوشیمیایی استئوپروتیک		گروه‌ها
آلکالین فسفاتاز (واحد بین المللی بر لیتر)	استئوکلسین (نانوگرم بر میلی لیتر)	
۹۸/۷۴±۴/۹۷	۳۴/۳۳±۳/۲۶	سالم
۵۸/۷۰±۴/۸۴†	۱۳/۷۲±۲/۰۴†	پیش‌آزمون
۶۲/۶۳±۵/۹۷	۱۵/۱۹±۲/۹۱	کنترل
۵۷۰/۹۶±۵/۰۵	۵۲۵/۰۴±۲/۳۲	مقاومتی
۵*۸۳/۹۴±۶/۱۷	۵۲۷/۸۲±۲/۰۷	ترکیبی

†: نشانه اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه سالم. ‡: نشانه اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل، *: نشانه اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه مقاومتی، در سطح $p < 0/05$.

بحث

در این مطالعه، القاء پوکی استخوان در رت های نر سالم با تزریق صفاقی اتانول انجام شد. مصرف مفرط الکل علت شناخته شده ای برای بروز پوکی استخوان ثانویه گزارش شده است (برولیک^۱ و دیگران، ۲۰۱۰). اتانول به طور مستقیم مانع عملکرد استئوبلاست ها شده و با جلوگیری از فرآیندهای تکثیر سلولی، سنتز ماتریکس و معدنی شدن کامل واحدهای ساختاری، از طریق مهار شاخص های بیوشیمیایی تشکیل استخوان، از دست دادن توده استخوانی را تشدید نموده و سرانجام منجر به پوکی استخوان می شود (کالاسی و دیگران، ۲۰۰۴؛ شناوی و دیگران، ۲۰۱۳؛ پنگ و دیگران، ۱۹۹۱). رت های الکلی نسبت به گروه سالم کاهش معنی داری معادل ۴۲/۸ درصد و ۴۷ درصد به ترتیب در شاخص های بیومکانیکی استخوان شامل

حداکثر نیروی شکست و سفتی نشان دادند که با گزارش های ناتومی و دیگران (۲۰۰۲) و رنو و دیگران (۲۰۰۷) همسو است و از این طریق، وضعیت بروز پوکی استخوان در رت ها پس از تزریق اتانول تایید می گردد. مطالعات انجام شده در باره جنس ماده، از محدودیت هایی در سازگاری های اسکلتی بر حسب تغییرات هورمونی حکایت دارد (دیزاز کوریل^۲، ۲۰۱۳)، به همین دلیل، در این مطالعه از رت های نر برای مهار تاثیر منفی مداخلات ناخواسته استفاده شد. همچنین دوز مصرف اتانول در مدت زمان اعمال شده، اثر تخریبی بر متابولیسم بافت کبدی رت نر ندارد (کالاسی و دیگران، ۲۰۰۴؛ برولیک و دیگران، ۲۰۱۰)؛ بنابراین می توان چنین فرض کرد که اتانول تزریق شده، تنها شاخص مداخله در متابولیسم استخوان رت بوده است. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، ۱۲ هفته

1. Broulik
2. Diaz-Curiel

فسفاتاز و استئوکلسین سرم رت های تمرین کرده، احتمالاً نشان دهنده برقراری شرایط آنابولیک ناشی از برنامه تمرین است، به گونه ای که افزایش آلکالین فسفاتاز، موجب انتقال فشارهای مکانیکی به درون سیگنال های بیوشیمیایی شده و به این ترتیب، تشکیل یا معدنی شدن استخوان را افزایش می دهد. به علاوه، نتایج پژوهش حاضر از این نظریه که نشانگرهای بیولوژیکی استخوان، منعکس کننده مراحل مختلف تکثیر سلول های استئوبلاستیک و عملکرد آن ها است، حمایت می کند (ترتیبیان و دیگران، ۲۰۱۳). در باره شاخص های مکانیکی استخوان، مطالعه ما نشان داد که پس از ۱۲ هفته تمرینات مقاومتی و ترکیبی، حداکثر نیروی شکست و سفتی استخوان ران رت ها در برابر گروه کنترل، افزایش معنی داری پیدا کردند که با یافته های ناتومی و دیگران (۲۰۰۲)، رنو و دیگران (۲۰۰۷) و دراموند و دیگران (۲۰۱۳)؛ همخوانی دارد. تمرینات مقاومتی پویا به طور مستقیم با اعمال فشار مکانیکی از مسیر انقباضات عضلانی بر بافت استخوان، یا غیر مستقیم با افزایش یافتن توده عضلانی برای اعمال بار بر استخوان، بر هر دو بافت استخوانی کورتیکال و تراپیکولار، تاثیر مثبت می گذارند (سئیم^۲، ۲۰۱۲). احتمالاً بارهای مکانیکی اعمال شده بر استخوان در سطح آستانه تحریک، شیبی را در مایع استخوانی پر شده در شبکه لاکونار-کانالیکولار^۳ ایجاد می نمایند که منجر به یک آبشار از وقایع درون سلولی شامل بالارفتن سطوح کلسیمی داخل سلول، بیان عوامل رشدی، افزایش تولید ماتریکس استخوانی و در نهایت، استخوان سازی خواهد شد (ترنر^۴ و دیگران، ۲۰۰۳). به نظر می رسد که عوامل متعدد مانند الگوی فعالیت ورزشی، شدت کار، مدت و تکرار فعالیت بدنی، ممکن است پاسخ شاخص های متابولیسم استخوان به مداخله ورزش را تحت تاثیر قرار دهند (هوندا^۵ و دیگران، ۲۰۰۳). همچنین، تولید فشار مکانیکی بالا با توزیع غیر معمول و غیر یکنواخت آن در ترکیب دو نوع تمرین ورزشی استقامتی و قدرتی و اجرای همزمان آن، با نتایج

تمرین مقاومتی و ترکیبی، موجب افزایش معنی داری در سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز ویژه استخوان و استئوکلسین شد. این یافته ها حاکی از آن است که هنگام فرآیند ساخت یا بازسازی استخوان، شماری از آنزیم ها و پروتئین ها در خون آزاد می شوند که بازتابی از فعالیت سلول های سازنده استخوان یا استئوبلاست ها می باشند. در این میان، آلکالین فسفاتاز استخوانی از شاخص های سرمی حساس ساخت استخوان و نشانگر فعالیت آنزیمی استئوبلاست هاست. استئوکلسین نیز از پروتئین های ماتریکس خارج سلولی بوده که همراه آلکالین فسفاتاز در روند رشد و تمایز استئوبلاست ها و معدنی شدن استخوان نقش عمده ایفا می کنند (رستمی و دیگران، ۲۰۱۳). در این زمینه، لی و دیگران (۲۰۱۴) از استئوکلسین به عنوان شاخص تعیین کننده سرعت و میزان تشکیل استخوان درون ارگانسیم یاد می کنند و در تایید یافته های ما نشان دادند که افزایش سطح این نشانگر بیوشیمیایی به افزایش تشکیل استخوان منجر می شود. در مطالعه ناتومی و دیگران (۲۰۰۲) پس از ۴ هفته تمرین مقاومتی، ابتدائاً سطوح سرمی استئوکلسین رت های نر عقیم شده کاهش یافت، اما پس از ۸ هفته، افزایش نشان داد که با یافته های ما همخوانی دارد. تبیین این فرضیه در توجیه چنین افزایش ناپایداری، قابل تامل است و دال بر آن است که استئوکلسین احتمالاً در مراحل ابتدایی سازگاری با تمرینات ورزشی، به علت افزایش ترشح هورمون های استرس، به ویژه گلوکوکورتیکوئیدها، به طور موقت کاهش می یابد (فرانک^۱ و دیگران، ۱۹۹۱). در مقابل، کوالیه و دیگران (۲۰۰۳) و فونگ و دیگران (۲۰۱۲) در اجرای دو نوع تمرین مقاومتی مختلف، این گونه گزارش کردند که سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز استخوانی و استئوکلسین پس از ۸ هفته تمرین به ترتیب در رت های نر و ماده، بدون تغییر باقی می ماند. به طور کلی، بر پایه فرضیه انتقال فشارهای مکانیکی (برینگتون و دیگران، ۱۹۸۵)، مطالعه ما آشکار می کند که افزایش معنی دار آلکالین

1. Franck

2. Saiem

3. Lacunar-canalicular network

4. Turner

5. Honda

متابولیسمی تشکیل و بازجذب استخوان است. از این رو، می توان اظهار داشت که نتایج ارزیابی شاخص های تشکیل استخوان، نشانه تاثیر این گونه فعالیت های بدنی بر تعادل واگردش استخوان است و پیشنهاد می شود که در کنار شاخص های تشکیل استخوان، عوامل موثر در بازجذب نیز اندازه گیری شوند، تا همزمان هم شرایط آنابولیک و هم شرایط کاتابولیک متابولیسم استخوان، مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه گیری: مداخله تمرین ترکیبی در مقایسه با تمرین مقاومتی، احتمالاً حفاظت مطلوب تری را در برابر پوکی استخوان فراهم می نماید. یافته های به دست آمده این نکته را نیز آشکار می کند که هنگام مطالعه استحکام بافت استخوان، وقوع سازگاری تمرین ترکیبی با انتخاب همزمان مولفه های بیومکانیکی و بیوشیمیایی، ممکن است ارزیابی روشن تری از فرآیند مداخله تمرین ورزشی بر استخوان استئوپروتیک را نشان دهد.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از کادر خانه حیوانات گروه زیست جانوری دانشگاه اصفهان و پرسنل آزمایشگاهی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که در سنجش متغیرها کمک شایانی نمودند، صمیمانه قدردانی می شود.

مثبتی در پاسخ مکانیکی و بیوشیمیایی فرآیند بازسازی استخوان همراه است، به طوری که در کنار مطالعه خواص مکانیکی استخوان، سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز استخوانی نیز در رت های گروه ترکیبی افزایش بیشتری نسبت به گروه مقاومتی نشان داد. با این حال باید توجه داشت که بالا بودن سطح استئوکلسین مشاهده نگردید. در این میان، شواهد علمی از حساسیت بیشتر استئوکلسین به دنبال تمرینات بی هوازی و آلکالین فسفاتاز پس از تمرینات هوازی حکایت دارند (بانفی^۱ و دیگران، ۲۰۱۰). بر این اساس، به نظر می رسد که اجرای تمرین هوازی در گروه ترکیبی، تراکم آلکالین فسفاتاز استخوانی را افزایش داده است، اما در سطح سرمی استئوکلسین تغییر معنی داری ایجاد نکرده است. با توجه به این موضوع که بازجذب استخوان از مراحل عمده در بازسازی استخوان است، به نظر می رسد که بررسی دقیق تر اثرات تمرینات ورزشی بر واگردش بافت اسکلتی^۲ و انعکاس واقعی تغییرات متابولیسم استخوان، نیازمند سنجش همزمان شاخص های بیوشیمیایی تشکیل و بازجذب استخوان است. افزایش خواص بیومکانیکی استخوان در مطالعه حاضر که نشان دهنده بهبود کیفیت استخوان می باشد، برآیند فرآیندهای

منابع

- Banfi, G., Lombardi, G., Colombini, A., & Lippi, G. (2010). Bone metabolism markers in sports medicine. *Sports Medicine*, 40(8), 697-714.
- Beck, T. J., Kohlmeier, L. A., Petit, M. A., Wu, G., Leboff, M. S., & Cauley, J. A. (2011). Confounders in the Association between exercise and femur bone in postmenopausal women. *Medicine Science Sports Exercise*, 43(1), 80-89.
- Brighton, C.T., Katz, M. J., & Goll, S. R. (1985). Prevention and treatment of sciatic denervation disuse osteoporosis in the rat tibia with capacitively coupled electrical stimulation. *Bone*, 6(2), 87-97.
- Broulik, P. D., Vondrova, J., Ruzicka, P., Sedlacek, R., & Zima, T. (2010). The Effect of Chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiology Research*, 59(1), 599-604.
- Callaci, J. J., Juknelism D., Patwardhan, A., Sartori, M., Frost, N., & Wezeman, F. H. (2004). The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 28(1), 182-191.

- Cassilhas, R. C., Reis, I. T., Venancio, D., Fernandes, J., Tufik, S., & Mello, M. T. (2013). Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. *Motriz Rio Claro*, 19(1), 178-184.
- Cavalié, H., Horcajada-Molteni, M. N., Lebecque, P., Davicco, M. J., Coxam, V., & Lac1, G. (2003). Progressive isometric force training and bone mass in rats. *Journal of Musculoskeletal Neuron Interact*, 3(1), 47-52.
- Chen, X., Aoki, H., & Fukui, Y. (2004). Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 14(1), 53-59.
- De Souza, E. O., Tricoli, V., Junior, C. B., Pereira, M. G., Brum, P. C., & Oliveira, E. M. (2013). The acute effects of strength, endurance and concurrent exercises on the Akt/mTOR/p70S6K1 and AMPK signaling pathway responses in rat skeletal muscle. *Medical and Biological Research*, 46(3), 343-347.
- Diaz-Curiel, M. (2013). Effects of Exercise on Osteoporosis. *Osteoporosis Physical Activity*, 1(2), 104-106.
- Drummond, L. R., Carlo R. J, Melo, S. F. S, Junior, M. A. C., Silva, K. A., & Rodrigues, A.C. (2013). Enhanced femoral neck strength in response to weightlifting exercise training in maturing male rats. *International Sport Medicine Journal*, 14(3), 155-167.
- Foong, K. O., Singh, R. J., & Singh, H. J. (2012). Changes in bone turnover markers and bone mass with reducing levels of jumping exercise regimens in female rats. *Asian Journal of Sports Medicine*, 3(4), 225-232.
- Franck, H., Beuker, F., & Gurk, S. (1991). The effect of physical activity on bone turnover in young adults. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 98(3), 42-46.
- Helder, F. D., Moreira, G., Coriolano, H. J. A., & Duarte, J. A. (2013). Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Medicine*, 10(3), 1007-1013.
- Honda, A., Sogo, S., Nagasawa, S., Shimizu, T., & Umemura, Y. (2003). High-impact exercise strengthens bone in rats ovariectomized with the same outcome as Sham rats. *Applied Physiology*, 95(1), 1032-1037.
- Hossenli, M., AghaAlinejad, H., Peeri, M., & Hajsadeghi, S. H. (2008). Effect of endurance, resistance and concurrent training on the heart structure of the female university students. *Olympic*, 16(4), 29-38. [Persian]
- Iwamoto, J., Takeda, T., & Sato, Y. (2005). Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Experimental Animals*, 54(3), 1-6.
- Joo, Y. I., Sone, T., Fukunaga, M., Lim, S. G., & Onodera, S. (2003). Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone*, 33(1), 485-493.
- Lester, M. E., Urso, M. L., Evans, R. K., Pierce, J. R., Spiering, B. A., & Maresh, C. M. (2009). Influence of exercise mode and osteogenic index on bone biomarker responses during short-term physical training. *Bone*, 45(4), 768-776.
- Li, L., Chen, X., Lv, S., Shuang, L.V., Dong, M., Li, Z., & Jiaheng, T. (2014). Influence of exercise on bone remodeling-relate hormones and cytokines in ovariectomized rats: A model of postmenopausal osteoporosis. *Plos One*, 9, 11, 1-10.
- Maimoun, L., & Sultan, C. H. (2011). Effects of physical activity on bone remodeling. *Metabolism Clinical and Experimental*, 60(3), 373-388.
- Multani, N. K., Kaur, H., & Chahal, A. (2011). Impact of sporting activities on bone mineral density. *Exercise Science and Physiotherapy*, 7(2), 103-109.
- Notomi, T., Okazaki, Y., Okimoto, N., Tanaka, Y., Nakamura, T., & Suzuki, M. (2002). Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in orchidectomized growing rats. *Applied Physiology*, 93(1), 115-1158.
- Peng, T. C., Lian, J. B., Hirsch, P. F., & Kusy, R. P. (1991). Lower serum osteocalcin in ethanol-fed rats. *Journal of Bone Mineral Research*, 6(2), 107-115.

- Renno, A. C. M., Gomes, A. R. S., Nascimento, R. B., Salvini, T., & Parizoto, N. (2007). Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. *Experimental Gerontology*, 42(1), 517-522.
- Rostami, Z. H., Eftekhari, M. H., Emami, M. J., & Rajaeefard, A. (2013). The impact of «vitex agnus castus» extract on osteogenic and angiogenic factors and fracture healing in women with long bone fracture. *Iranian Journal of Orthopedic Surgery*, 11(2), 63-68. [Persian]
- Saiem, A. M. H. (2012). Bone mineral status response to aerobic versus resistance exercise training in postmenopausal women. *World applied sciences*, 16(6), 806-813.
- Seibel, M. J. (2005). Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clinical Biochemistry Review*, 26(11), 97-122.
- Shenawy, S. M. A., Yassin, N. A. Z., Badary, O. A., Moneem, M. A., & Shafeiy, H. M. (2013). Study of the effect of *Allium porrum* on osteoporosis induced in rats. *Der Pharmacia Lettre*, 5(1), 188-198.
- Tartibian, B., Motabsaei, N., & Tolouei-Azar, J. (2013). The influence of nine-week intensive aerobic exercises, calcium and vitamin D supplementation on the metabolic response of bone formation biomarkers. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 15(2), 45-50. [Persian]
- Turner, C. H., & Robling, A. G. (2003). Designing exercise regimens to increase bone strength. *Exercise Sport Science*, 31(3), 45-50.

Abstract**The effect of resistance and combined training on biochemical markers of bone formation and femoral bending strength of osteoporotic male rats**Farzad Nazem¹, Abbas Salehikia², Seyed Mohammad Marandi³, Seyed Jalal Moshtaghian⁴, Arsham Rashid Kaboli⁵

Background and Aim: There is a little information available regarding the effect of resistance and combined training on biomechanical response of bone in osteoporosis condition. This study evaluated the effect of combined training compared to resistance training on bone formation markers and femoral mechanical strength of osteoporotic male Rats. **Materials and Methods:** Among forty male Wistar rats, 8 rats were selected as healthy group, then osteoporosis were induced by intraperitoneal injection of 20% alcohol during 3 weeks for other rats. Osteoporotic rats were divided into 4 groups as: baseline, resistance, combined and control. The resistance training protocol consisted of 8 series of climbing activity on the vertical ladder with weights tied to animal tail. Combined group completed the both of resistance and endurance protocol (60 min/day, 12 m/min speed). After completing 12 weeks of exercise trainings (5 days a week), the blood samples were collected and serum levels of osteocalcin and bone specific alkaline phosphatase was measured by ELISA method. Excised left femurs were examined by three point bending test to obtain the maximum force and stiffness. The data were analyzed by one way-ANOVA and Tukey post hoc tests. A p-value (0.05) was set for data statistical analysis. **Results:** Two groups of the combined and resistance training showed a significantly increased on all measured parameters versus to control group ($p < 0.05$). The effect of combined training on serum of bone specific alkaline phosphatase ($p = 0.04$) and bone mechanical strength ($P = 0.0001$) was more significant than resistance training. **Conclusion:** Perhaps the combined training provides more protection against of osteoporosis compared to resistance training.

Keywords: Exercise, Bone formation markers, Mechanical strength, Osteoporosis.

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, vol. 3, no. 6, Fall & Winter, 2015/2016

Received: 12 Jul, 2015

Accepted: 13 Sep, 2015

1. Associate Professor, Sport Physiology Department, Physical Education and Sport Sciences Faculty, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran.

2. Assistant Professor, Sport Physiology Department, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran. Email: salehikia@ped.usb.ac.ir

3. Full Professor, Sport Physiology Department, Physical Education and Sport Sciences Faculty, Isfahan University, Isfahan, Iran.

4. Assistant Professor, Animal Science Department, Isfahan University, Isfahan, Iran.

5. MA in Animal Science Department, Isfahan University, Isfahan, Iran.