

## Evaluation of Analgesic, Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Genistein and Swimming in Ovariectomized Rats

Habibi P<sup>1</sup>, Yousefi H\*<sup>2</sup>, Khazaei M<sup>1</sup>, Zarei M<sup>3</sup>, Salehi I<sup>1</sup>, Jamali-Delfan R<sup>1</sup>, Afshar S<sup>4</sup>

1. Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2. Department of Basic Medical Sciences, Khoy University of Medical Sciences, Khoy, Iran
3. Department of Physiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\* *Corresponding author.* Tel: +984436257668, Fax: +984436257668, E-mail: yousefi\_h@khoyums.ac.ir

Received: Jul 11, 2022

Accepted: Oct 30, 2022

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Menopause and especially acute menopause due to surgery is associated with many complications in women. The aim of this study was to determine the effects of genistein and regular swimming exercise (alone/or in combination) on pain through a possible mechanism of inflammation and oxidative stress in ovariectomized rats.

**Methods:** In this study, rats were divided into six groups, including: control, sham, ovariectomy (OVX), ovariectomized with eight weeks of swimming exercise training (OVX.E), ovariectomized with eight weeks of genistein administration (OVX.G), and ovariectomized with eight weeks of combined treatment (OVX.G.E). The effects of genistein and/or exercise were evaluated by examining the pain intensity with tail-flick and formalin tests. The serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), total antioxidant capacity (TAC), total oxidant status (TOS), and malondialdehyde (MDA) were also evaluated by ELISA and spectrophotometer.

**Results:** In the OVX group compared to the control group, tail-flick and formalin tests showed an increase in pain response. Also, a significant increase in the serum levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MDA, TOS and a decrease in TAC was observed in the OVX group, however, in the OVX.E, OVX.G and especially OVX.E.G groups, pro-inflammatory cytokines and oxidative stress as well as pain responses showed a significant decrease compared to the OVX group.

**Conclusion:** A combination of genistein and regular swimming exercise was synergistically more effective in reducing acute and chronic pain than using them alone in the postmenopausal period.

**Keywords:** Postmenopausal Pain; Genistein; Exercise; Pro-inflammatory Cytokines; Oxidative Stress

# بررسی اثرات ضد دردی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی جنیستئین و ورزش شنا در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده

پریسا حبیبی<sup>۱</sup>، هادی یوسفی<sup>۲\*</sup>، مهدی خزایی<sup>۱</sup>، محمد زارعی<sup>۳</sup>، ایرج صالحی<sup>۱</sup>، رضا جمالی دلفان<sup>۱</sup>، سیمین افشار<sup>۴</sup>

۱. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲. گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده علوم پزشکی خوی، خوی، ایران

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۴. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۴۳۶۲۵۷۶۶۸ فاکس: ۰۴۴۳۶۲۵۷۶۶۸ پست الکترونیک: yousefi\_h@khoyums.ac.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** یائسگی و مخصوصاً یائسگی حاد در اثر جراحی با مشکلات متعددی در زنان همراه می‌باشد. هدف این مطالعه تعیین اثرات جنیستئین و ورزش منظم شنا (به تنهایی/ یا ترکیبی) بر درد از طریق مکانیسم احتمالی التهابی و استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده بود.

**روش کار:** در این مطالعه موش‌های صحرایی به شش گروه شامل: گروه کنترل، گروه شم، گروه اواریکتومی شده (OVX)، گروه اواریکتومی شده با هشت هفته تمرین ورزشی شنا (OVX.E)، گروه اواریکتومی شده با هشت هفته تجویز جنیستئین (OVX.G) و گروه اواریکتومی شده با هشت هفته درمان ترکیبی ورزش و جنیستئین (OVX.G.E) تقسیم شدند. اثرات جنیستئین و/ یا ورزش با بررسی شدت درد با استفاده از تست‌های تیل- فلیک و فرمالین ارزیابی شد. سطوح سرمی اینترلوکین یک بتا (IL-1 $\beta$ ) و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- $\alpha$ ) و سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)، وضعیت اکسیدان کل (TOS) و مالون دی‌آلدئید (MDA) توسط ELISA و اسپکتروفتومتر ارزیابی شدند.

**یافته‌ها:** در گروه OVX در مقایسه با گروه کنترل، آزمایشات تیل- فلیک و فرمالین نشان از افزایش پاسخ درد داشتند. همچنین افزایش معنی‌داری در سطوح سرمی فاکتورهای IL-1 $\beta$ ، TNF- $\alpha$ ، MDA، TOS و کاهش TAC، در گروه OVX مشاهده شد؛ ولی در گروه‌های OVX.E، OVX.G و مخصوصاً OVX.E.G سایتوکین‌های پیش‌التهابی و استرس اکسیداتیو و همچنین پاسخ‌های درد کاهش معنی‌داری نسبت به گروه OVX از خود نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** ترکیبی از جنیستئین و ورزش منظم شنا دارای اثر هم‌افزایی و محافظتی بیشتری در کاهش درد حاد و مزمن نسبت به استفاده از این روش‌ها به تنهایی در دوره یائسگی است.

**واژه‌های کلیدی:** درد پس از یائسگی، جنیستئین، ورزش، سایتوکین‌های التهابی، استرس اکسیداتیو.

پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۷

دریافت: ۱۴۰۱/۴/۲۰

## مقدمه

می‌گذارد [۱]. برخی از زنان، یائسگی زودرس (قبل از سن فیزیولوژیک) را به علل مختلف از جمله برداشتن تخمدان‌ها در اثر سرطان و... تجربه می‌کنند [۲]. بنابراین، آنها به دلیل افت ناگهانی هورمون‌های

یائسگی یک مرحله طبیعی در زندگی زنان است که معمولاً با برخی علائم و تغییراتی در عملکرد اعضای بدن همراه است که بر سبک زندگی آنها تأثیر

استروئیدی تخمدان، به ویژه استروژن، دچار اختلالات شدید عملکردی مانند اختلالات قلبی عروقی، عصبی و شناختی می‌شوند. مطالعات متعدد نشان داده است که استروژن از توانایی حفاظت عصبی نیز برخوردار است [۳] و این مکانیسم محافظتی استروژن از طریق مسیرهای ژنومی و غیرژنومیکی رخ می‌دهد. اثرات ژنومی از طریق گیرنده‌های آلفا و بتا در آستروسیت‌های قشر مغز، نورون‌ها و سلول‌های اندوتلیال اعمال می‌شود. همچنین نوع سوم گیرنده‌های استروژن به نام گیرنده‌های پروتئینی متصل شده به پروتئین G30 (GPR30) در غشای سلول، اثرات استروژن را از طریق یک مسیر غیرژنومی افزایش می‌دهد [۴]. یکی از تأثیرات حیاتی استروژن، در روند حس درد و در نتیجه کاهش حس درد است که احتمالاً ممکن است این اثر استروژن از طریق تعادل بین نورون‌های انکفالینرژیک، کاتکول آمینرژیک و سروتونرژیک باشد [۵]. بعلاوه در مطالعات اپیدمیولوژیک نیز تفاوت آستانه درد زنان و مردان و نیز اثرات تزریق استروژن در مردان و افزایش آستانه درد در این افراد گزارش شده است که نشان‌دهنده اثرات ضد دردی استروژن می‌باشد [۶]. مکانیسم‌های مرکزی درگیر در اثرات ضد درد استروژن ممکن است شامل سیستم‌های اوبیوئیدی، دوپامینرژیک و نورآدرنرژیک باشد [۷]. بدلیل عوارض متعدد یائسگی، درمان جایگزین با هورمون به ویژه تجویز استروژن، یک راه‌حل بالقوه برای جلوگیری از عوارض یائسگی است [۸]. از طرف دیگر، گزارش‌هایی وجود دارد که تجویز استروژن پس از یائسگی خطر سرطان پستان و تمام سکنه‌ها را افزایش می‌دهد [۹، ۱۰]. بنابراین، با توجه به موارد اشاره شده، تجویز استروژن برای جلوگیری از اثرات مزمن در زنان یائسه توصیه نمی‌شود. بر این اساس، محققان به دنبال روش‌های جایگزین برای جبران کمبود استروژن هستند. فیتواستروژن‌ها ترکیبات گیاهی غیر استروئیدی با شباهت ساختاری به  $\beta$ ۱۷-استرادیول

بوده و دارای اثرات استروژنی هستند [۱۱]. جنیستئین، به عنوان یک فیتواستروژن، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی شدید هست و میل زیادی به گیرنده‌های استروژن دارد که منجر به فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ استروژن می‌شود. جنیستئین به ترتیب به عنوان آگونیست یا آنتاگونیست گیرنده استروژن عمل می‌کند، که به ترتیب به سطح استروژن کم یا زیاد بستگی دارد [۱۲]. بنابراین جنیستئین در فقدان استروژن، به نظر می‌رسد به دلیل اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و محافظت عصبی در مدل یائسگی حاد یا بصورت جراحی، یک گزینه بالقوه برای کاهش عوارض یائسگی باشد [۱۳]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که جنیستئین از طریق اثر بر سائتوکین‌ها در میکروگلیا، آستروسیت و سلول‌های ایمنی در تعدیل سیستم ایمنی نقش دارد [۱۴]. از طرف دیگر، ثابت شده است که ورزش و فعالیت بدنی تأثیرات مثبتی بر سلامت قلب و عروق دارند و استرس، افسردگی و درد را کاهش می‌دهند. ورزش باعث افزایش آستانه درد در افراد سالم شده و باعث تسکین درد در شرایطی مانند کمردرد، آرتروز و فیبرومیالژی می‌شود [۱۵]. طبق این شواهد، فعالیت بدنی منظم نیز می‌تواند تا حدودی اثرات کمبود استروژن در زنان یائسه را کاهش دهد. با این حال اثرات ضد دردی مداخله ورزش و جنیستئین به تنهایی و یا بصورت ترکیبی، بعد از یائسگی هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تأثیر ضددردی جنیستئین به تنهایی یا همراه با تمرینات ورزشی با استفاده از تست‌های تیل فلیک و فرمالین و بیان سرمی نشانگرهای زیستی اکسیداتیو و التهابی همانند MDA, TAC, TOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  در موش‌های صحرایی ماده اواریکتومی شده انجام شد.

## روش کار

## حیوانات

در مطالعه حاضر، ۶۰ سر موش صحرایی ماده بالغ (۲۵۰-۳۰۰ گرم و ده هفته‌ای) استفاده شد. موش‌ها از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی همدان خریداری و تحت شرایط کنترل شده نگهداری شدند (دما ۲۲-۲۴ درجه سانتی گراد با ۱۲ ساعت چرخه تاریکی و روشنایی) و طی آزمایشات نیز رژیم غذایی استاندارد و آب را بصورت آزادانه دریافت کردند. پروتکل آزمایشات حیوانات نیز توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان تأیید شد. پس از یک هفته سازگاری، حیوانات به طور تصادفی به شش گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند که شامل: ۱. کنترل، ۲. شم (که فقط تحت عمل جراحی بدون برداشتن تخمدان‌ها قرار گرفتند)، ۳. OVX (برداشت دو طرفه تخمدان‌ها)، ۴. OVX.E (برداشت دو طرفه تخمدان‌ها+ورزش)، ۵. OVX.G (برداشت دو طرفه تخمدان‌ها+تجویز جنیستین) و ۶. OVX.G.E (برداشت دو طرفه تخمدان‌ها+تجویز جنیستین+تجویز جنیستین+ورزش) بودند. ده روز پس از جراحی، در گروه‌های مربوطه مداخلات جنیستین و ورزش اعمال شد.

## تأیید و رضایت اخلاقی برای مشارکت

کلیه مراحل آزمایشی با استفاده از موش صحرایی توسط راهنماهای استفاده از حیوانات مصوب کمیته اخلاق نهادی در دانشگاه علوم پزشکی همدان (کد اخلاق: IR.UMSHA.REC.1398.173) و به دنبال راهنمای انستیتوی ملی بهداشت برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

## جراحی تخمدان

موش‌ها با کتامین (۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن؛ روتکس مدیکا، آلمان) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن؛ شانل، ایرلند) بیهوش شده و یک جراحی شکمی جزئی انجام شد. پس از مشاهده تخمدان‌ها با یک نخ بخیه محکم

اطراف مجرای اویداکت و رگ‌های خونی تخمدان بسته شد. مجرای اویداکت برش داده شده و تخمدان جدا گردید. سپس پوست و دیواره‌های عضله بخیه زده شد [۱۶].

## ورزش

یک هفته پس از جراحی، موش‌های گروه‌های ورزش به مدت پنج روز متوالی در استخر آب حدود ۲۰-۵ دقیقه در روز شنا کردند. پس از آن، حیوانات آموزش دیده به مدت شش روز متوالی در هفته (۶۰ دقیقه در روز) به مدت هشت هفته شنا کردند. برای انجام شنا و جلوگیری از شناور ماندن موش‌ها در روی آب، یک پمپ آب جهت ایجاد جریان آب در استخر شنا قرار داده شد. تمام آزمایشات بعدی ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه شنا و با خونگیری از آئورت شکمی تحت بیهوشی انجام شد [۱۷].

## تجویز جنیستین

جنیستین (۱ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز) [شرکت شیمیایی سیگما؛ سنت لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا] شش روز در هفته و به مدت هشت هفته به صورت زیر جلدی تزریق شد [۱۸].

تست تیل-فلیک<sup>۱</sup>

این آزمایش با استفاده از دستگاه تیل فلیک (Harvard Tail-Flick Meter، USA، LE7106) انجام گرفت. در این تست یک جریان نوری با حساسیت قابل تنظیم، پرش دم را تشخیص می‌دهد و تأخیر اتوماتیک آن در یک صفحه نمایش دیجیتال قابل مشاهده است. شدت نور مورد استفاده برابر با ۷ بود و از مدت زمان مرجع ۱۰ ثانیه به عنوان زمان قطعی نوردهی<sup>۲</sup> استفاده شد. یعنی چنانچه حیوان تا مدت ۱۰ ثانیه پس از تابش نور سوزان، دم خود را نمی‌کشید (پرش دم)، به منظور جلوگیری از آسیب بافتی، محرک قطع می‌شد. حیوان به صورت افقی در محفظه مخصوص نگهداری حیوان قرار گرفت و دم آن آزاد بود. مدت

<sup>۱</sup> Tail-Flick Test

<sup>۲</sup> Cut-Off Time

زمان تاخیر در کشیدن دم در سه مرتبه و به فاصله دو دقیقه تا ۲۰ دقیقه اندازه گیری شده و میانگین آن به عنوان زمان تاخیر محسوب و ثبت گردید.

#### تست فرمالین<sup>۱</sup>

برای انجام این تست، تزریق ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۲/۵٪ بصورت زیر جلدی در سطح کف پای چپ عقبی با سوزن شماره ۳۰ انجام شد. حیوان را در جعبه آزمایش مخصوص (۳۲×۳۲×۳۲ سانتی متر) آزمایش فرمالین قرار داده تا به شرایط آزمایش عادت کند. آینه‌ای که در ۴۵ درجه قرار داشت در زیر جعبه و در مقابل اپراتور قرار گرفت تا رفتارهای حیوان را با وضوح بیشتری مشاهده کند. هر ۱۵ ثانیه، پاسخ فیزیکی به درد که به صورت ۰، ۱، ۲ یا ۳ درجه بندی شده بود ثبت می‌گردید. وقتی حیوان در هنگام حرکت تعادل کامل داشت و وزن او بین پاها تقسیم می‌شد، از عدد صفر استفاده می‌شد. شماره ۱ برای زمانی بود که حیوان وزن خود را بر روی پای تزریق شده تحمیل نکرده است، یا هنگامی که از پا مراقبت می‌کند. شماره ۲ برای زمانی که حیوان پای دردناک را بالا می‌برد تا کف ظرف را لمس نکند، و شماره ۳ حیوانی را نشان می‌داد که پای دردناک را لیس می‌زد، می‌جوید یا سریع تکان می‌داد. میانگین ۵ دقیقه اولیه آزمون به عنوان مرحله اول آزمون فرمالین (مرحله حاد) در نظر گرفته شد و میانگین ۱۵-۶۰ دقیقه آزمون به عنوان مرحله دوم (مرحله تونیک) در نظر گرفته شد.

#### سنجش TNF- $\alpha$ و IL1- $\beta$

نمونه خون از آئورت شکمی حیواناتی که بیهوش شده بودند به دست آمد. بعد از حذف لخته‌های خون، سطح TNF- $\alpha$  و IL1- $\beta$  سرم با کیت‌های ELISA اندازه‌گیری شد (به ترتیب Abcam و BioLegend, USA). طبق دستورالعمل سازنده، غلظت‌ها به صورت pg/ml بیان شد.

**سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)**  
نمونه‌ها ابتدا سانتی‌فیوژ شده و با n-butanol مخلوط شد و جذب نوری آن در ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای بیان نتایج از منحنی استاندارد تترا اتوکسی پروپان استفاده شد.

**سنجش وضعیت اکسیدان کل (TOS)**  
برای ارزیابی TOS در سرم از تکنیک Erel استفاده شد اساس این روش شامل اکسیداسیون آهن فروس به آهن فریک و تشکیل کمپلکس رنگی با زایلنول نارنجی می‌باشد. تعداد مولکول‌های اکسیدان نمونه با شدت رنگی که آهن فریک با زایلنول نارنجی در محلول اسیدی ایجاد می‌کند، مرتبط است. این شدت با طیف‌سنجی ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود.

**سنجش سطح مالون دی‌آلدئید (MDA)**  
MDA که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد، در نمونه‌های سرم با استفاده از مواد واکنش‌دهنده اسید تیوباربتوریک ارزیابی شد. در این روش تری کلرواستیک اسید به سرم اضافه شده و سپس این ترکیب به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. نمونه‌ها پس از سرد شدن روی یخ، سانتی‌فیوژ شده و با n-butanol مخلوط شدند و سپس جذب آن در ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای بیان نتایج از منحنی استاندارد تترا اتوکسی پروپان استفاده شد.

#### تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از GraphPad Prism-6.01 انجام شد. سطح معنی‌داری تست‌های آماری در مورد همه‌ی تست‌ها  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  SEM نشان داده شدند. جهت مقایسه کمی از آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA) و تست تعقیبی توکی<sup>۲</sup> استفاده گردید.

<sup>2</sup> Tukey

<sup>1</sup> Formalin Test

**یافته‌ها**

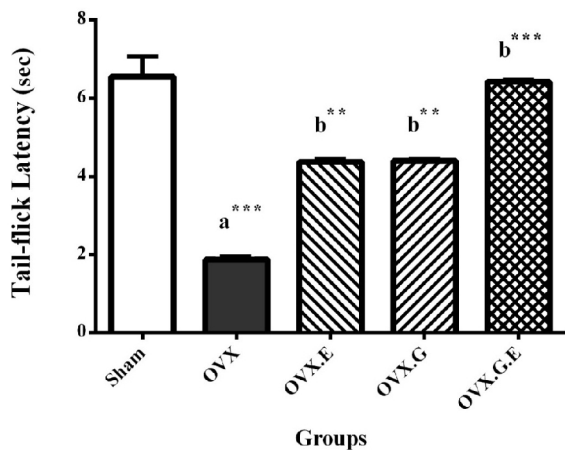
در تمامی تست‌ها اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه شاهد مشاهده نشد. بنابراین برای نشان دادن تجزیه و تحلیل آماری فقط از گروه‌های شام استفاده شده است.

**تست تیل-فلیک**

آنالیز داده‌های آماری حاصل از تست تیل-فلیک در تعداد ۱۰ موش صحرایی در هر گروه حاکی از تاخیر معنی‌دار در پرش دم (TFL) موش‌های اواریکتومی شده در مقایسه با گروه شام بود ( $p < 0.001$ ). با این حال، ورزش منجر به افزایش قابل توجه TFL از  $1/87 \pm 1/0.1$  ثانیه به  $4/37 \pm 0/0.7$  ثانیه در گروه OVX.E نسبت به گروه OVX شد ( $p < 0.01$ ). از طرف دیگر، درمان با ۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم در روز جنیستین به ترتیب با افزایش TFL از  $1/87 \pm 1/0.1$  ثانیه به  $4/40 \pm 0/0.4$  ثانیه در OVX.G نسبت به گروه OVX همراه بود و اثر ضد درد قابل توجهی نشان داد ( $p < 0.001$ ). همچنین ترکیب ورزش همراه با جنیستین منجر به اثرات ضد دردی بیشتری شد و منجر به افزایش TFL از  $1/87 \pm 1/0.1$  ثانیه در OVX.E.G به  $6/42 \pm 0/0.4$  ثانیه در

**تست فرمالین (n=10 در هر گروه)**

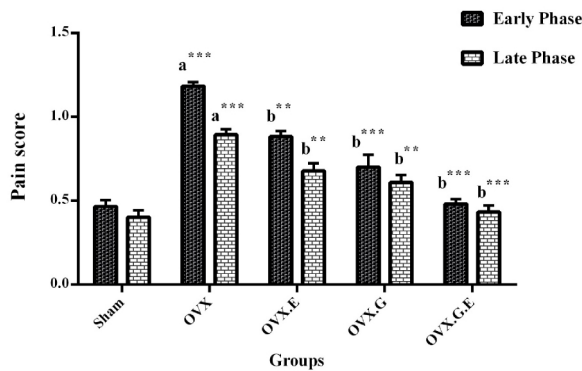
طبق نتایج نشان داده شده در شکل ۲، گروه اواریکتومی شده در مراحل حاد و مزمن آزمایش فرمالین در مقایسه با گروه شام اثر حساسیت به درد قابل توجهی داشت ( $p < 0.001$ ). درمان موش‌های اواریکتومی شده با ۱ میلی گرم در کیلوگرم در روز جنیستین و ورزش (هر یک به تنهایی) در مقایسه با گروه OVX باعث کاهش نمره درد در هر دو مرحله (مزمن و حاد) شد. با این حال، گروه دریافت کننده توام جنیستین و ورزش اثر ضد دردی قابل توجهی را در هر دو مرحله درد نسبت به گروه اواریکتومی شده نشان داد ( $p < 0.001$ ).



شکل ۱. اثرات ضد دردی تمرینات ورزشی شنا و تجویز جنیستین (۱ میلی گرم در کیلوگرم در روز) در آزمایش تیل-فلیک (n=10 در هر گروه)

هر ستون زمان واکنش ۱۰ حیوان را در هر گروه به عنوان میانگین  $\pm$  SEM نشان می‌دهد. تفاوت با مقادیر  $p < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار است.  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$

حرف a تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های Sham و OVX و حرف b تفاوت معنادار بین گروه‌های OVX، OVX.E، OVX.G و OVX.G.E. OVX: گروه اواریکتومی شده، OVX.E: اواریکتومی شده با ۸ هفته ورزش، OVX.G: اواریکتومی شده با ۸ هفته تجویز جنیستین، OVX.G.E: اواریکتومی شده با ۸ هفته درمان ترکیبی ورزش و جنیستین.



شکل ۲. مقایسه تأثیرات ورزش شنا و تجویز جنیستین (۱ میلی گرم در کیلوگرم در روز) در مراحل اولیه و دیررس آزمایش فرمالین (n=10 در هر گروه)

هر ستون زمان واکنش ۱۰ حیوان را در هر گروه به عنوان میانگین  $\pm$  SEM نشان می‌دهد. تفاوت با مقادیر  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار است.  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$

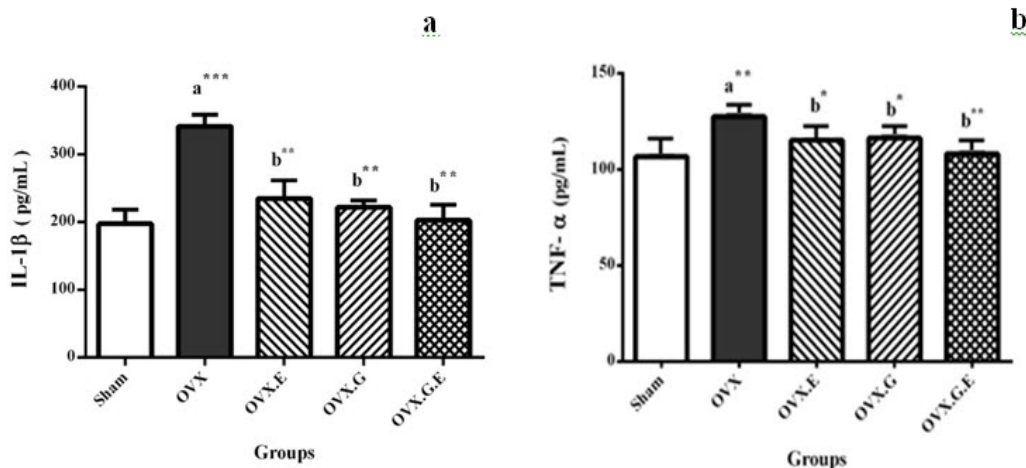
حرف a تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های Sham و OVX و حرف b تفاوت معنادار بین گروه‌های OVX، OVX.E، OVX.G و OVX.G.E. OVX: گروه اواریکتومی شده، OVX.E: اواریکتومی شده با ۸ هفته ورزش، OVX.G: اواریکتومی شده با ۸ هفته تجویز جنیستین، OVX.G.E: اواریکتومی شده با ۸ هفته درمان ترکیبی ورزش و جنیستین.

**اثرات جنیستئین، ورزش و درمان ترکیبی بر تغییرات**

**IL-1β و TNF-α در سرم (n=۱۰ در هر گروه)**

سطح IL-1β (شکل ۳a) و TNF-α (شکل ۳b) در حیوانات اواریکتومی شده نسبت به گروه شم به طور معنی دار افزایش یافت (p<۰/۰۰۱) (شکل ۳). ولی تیمار با جنیستئین و ورزش در گروه OVX.E یا OVX.G غلظت سرمی این فاکتورها را به طور معنی

داری نسبت به گروه OVX کاهش داد (p<۰/۰۱). همچنین سطح سرمی این واسطه‌های التهابی در گروه اواریکتومی شده با هشت هفته تمرین شنا همراه با تجویز جنیستئین کاهش قابل توجهی در مقایسه با گروه OVX نشان داد (p<۰/۰۱). این کاهش در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی داری نشان نداد.



شکل ۳. اثرات ورزش شنا و تجویز جنیستئین (۱ میلی گرم در کیلوگرم در روز) بر میزان IL-1β (a) و TNF-α (b) در حیوانات اواریکتومی شده (n=۱۰ در هر گروه)

مقادیر میانگین ± SEM، تفاوت با مقادیر P < 0.05 از نظر آماری معنی دار است. \*p < 0.05، \*\*p < 0.01 و \*\*\*p < 0.001. حرف a تفاوت معنی دار بین گروه‌های Sham و OVX و حرف b تفاوت معنادار بین گروه‌های OVX و OVX.E، OVX.G و OVX.G.E. اواریکتومی شده با ۸ هفته درمان ترکیبی ورزش و جنیستئین.

**اثرات جنیستئین، ورزش و درمان ترکیبی بر**

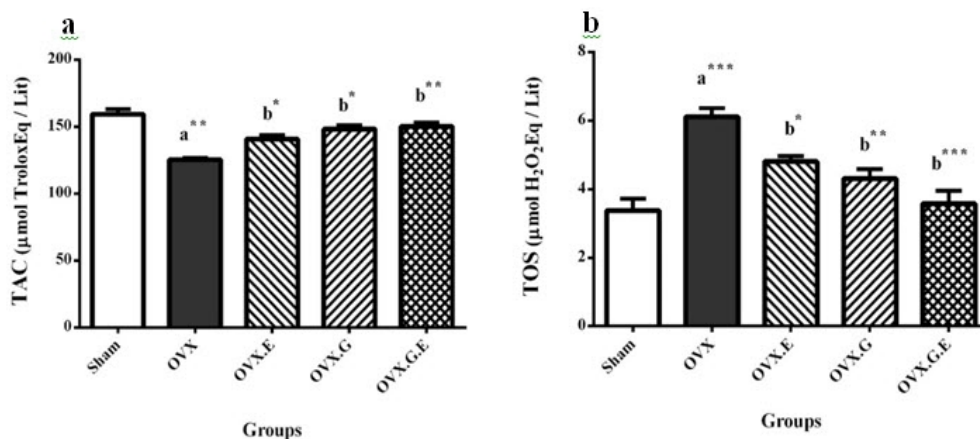
**مارکهای استرس اکسیداتیو**

شکل ۴ تغییرات مارکهای استرس اکسیداتیو را در تعداد ۱۰ حیوان در هر گروه نشان می‌دهد. آنالیز آماری نشان داد که گروه OVX باعث کاهش قابل توجه TAC (شکل ۴a) و افزایش سطح سرمی TOS (شکل ۴b) گردید (p<۰/۰۰۱). ولی تجویز جنیستئین یا ورزش به تنهایی (p<۰/۰۰۵) و در ترکیب با هم منجر به افزایش TAC و کاهش سطح TOS در مقایسه با گروه OVX شدند (p<۰/۰۰۱).

**اثرات جنیستئین، ورزش و درمان ترکیبی بر مالون**

**دی‌آلدئید (MDA)**

همانطور که شکل ۵ نشان می‌دهد (n=۱۰) در هر گروه برداشتن تخمدان‌ها در گروه OVX منجر به افزایش قابل ملاحظه ای در سطح MDA سرم نسبت به گروه شم شده است (p<۰/۰۰۱). در حالی که سطح سرمی MDA در گروه OVX.E و OVX.G و همچنین گروه OVX.G.E کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه OVX نشان دادند (p<۰/۰۰۵)، ولی این کاهش در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی داری نشان نداد.



شکل ۴. اثرات ورزش شنا و تجویز جنیستین (۱ میلی گرم در کیلوگرم در روز) بر سطح TAC (a) و TOS (b) در حیوانات اواریکتومی شده (n=۱۰ در هر گروه).

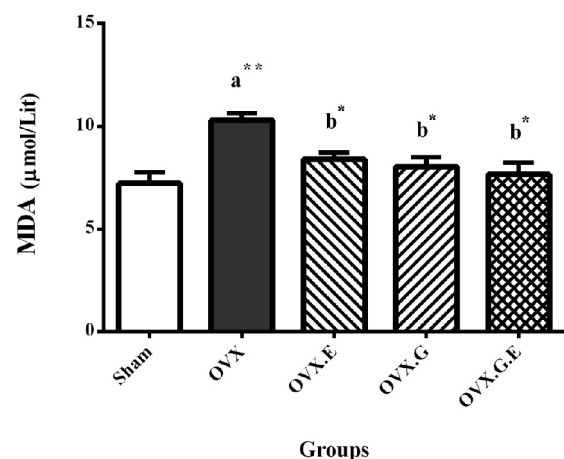
مقادیر میانگین  $\pm$  SEM، تفاوت با مقادیر  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار است.  $p < 0.01$  \* و  $p < 0.001$  \*\* و  $p < 0.0001$  \*\*\*

حرف a تفاوت معنی دار بین گروه های OVX و Sham و حرف b تفاوت معنادار بین گروه های OVX، OVX.E، OVX.G و OVX.G.E. گروه اواریکتومی شده، OVX.E. اواریکتومی شده با ۸ هفته ورزش، OVX.G. اواریکتومی شده با ۸ هفته تجویز جنیستین، OVX.G.E. اواریکتومی شده با ۸ هفته درمان ترکیبی ورزش و جنیستین.

### بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ورزش منظم شنا در ترکیب با تجویز جنیستین حساسیت درد شدید را در موش های اواریکتومی شده بهبود می بخشد. این نتایج کاملاً با کاهش قابل توجه غلظت سرمی  $\text{IL-1}\beta$  و  $\text{TNF-}\alpha$  و افزایش مارکرهای آنتی اکسیدانی در سرم سازگار بود.

بسیاری از زنان قبل از رسیدن به یائسگی طبیعی تحت عمل اووفاکتومی دو طرفه قرار می گیرند و در نتیجه باعث یائسگی زودرس می شوند. مهمترین علل این نوع جراحی بیماری های مختلفی مانند تومورها، بیماری های خوش خیم تخمدان یا پیشگیری از بدخیمی است [۱۶]. یائسگی باعث برخی مشکلات شناختی می شود که کیفیت زندگی در زنان را کاهش می دهد. از عوارض یائسگی می توان به اختلال شناختی یا زوال عقل، پارکینسون، پوکی استخوان و اختلال عملکرد جنسی و دیابت اشاره کرد [۱۷]. وقوع یائسگی در زنان در سنین مختلف می تواند با تأثیرات قابل توجهی بر فعالیت های سیستم درد همراه باشد که مکانیسم های مولکولی آن هنوز به طور کامل شناخته



شکل ۵. اثرات ورزش شنا و تجویز جنیستین (۱ میلی گرم در کیلوگرم در روز) بر میزان MDA در حیوانات اواریکتومی شده (n=۱۰ در هر گروه).

مقادیر میانگین  $\pm$  SEM، تفاوت با مقادیر  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار است.  $p < 0.01$  \* و  $p < 0.001$  \*\* و  $p < 0.0001$  \*\*\*

حرف a تفاوت معنی دار بین گروه های OVX و Sham و حرف b تفاوت معنادار بین گروه های OVX، OVX.E، OVX.G و OVX.G.E. گروه اواریکتومی شده، OVX.E. اواریکتومی شده با ۸ هفته ورزش، OVX.G. اواریکتومی شده با ۸ هفته تجویز جنیستین، OVX.G.E. اواریکتومی شده با ۸ هفته درمان ترکیبی ورزش و جنیستین.



نشده‌اند. یکی از اختلالات مهم در این زنان حساسیت زیاد به درد است. در واقع هورمون‌های تخمدانی در تعدیل درد نقش دارند. یکی از بیشترین اختلالات در سیستم درد، فرم حاد و غیر فیزیولوژیکی است که کمتر توصیف می‌شود [۱۹]. مطابق با این یافته‌ها، نتایج مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده افزایش حساسیت به درد در اثر اواریکتومی بود که احتمالاً می‌تواند ناشی از افزایش فاکتورهای التهابی مثل  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  و مارکرهای دخیل در فرایند استرس اکسیداتیو باشد.

استروژن می‌تواند درد را در زنان کاهش دهد، که نشان‌دهنده ارتباط آن با درد است. مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای مشاهده شده است که اواریکتومی در موش صحرایی منجر به حساسیت شدید به درد مکانیکی در پنجه پا و درد شدید حرارتی در قسمت‌های پروگزیمال و دیستال شده و باعث افزایش نمرات درد در آزمون فرمالین می‌شود [۲۰]. از طرف دیگر، برخی مطالعات هیچگونه تغییر یا کاهش حساسیت به محرک‌های دردناک ناشی از اواریکتومی را گزارش نکرده‌اند [۲۱]. طبق نتایج این مطالعه، در آزمایش تیل-فلیک مشخص شد که در حیوانات گروه اواریکتومی شده نسبت به گروه شم زمان واکنش پرش دم کمتر بود و نتایج آزمایش فرمالین نشان داد که این حیوانات از نظر آماری نمرات دردشان نسبت به گروه کنترل بالاتر است. این نتایج با برخی گزارش‌های قبلی مطابقت دارد که نشان می‌دهد حساسیت درد گروه اواریکتومی شده ممکن است با تجویز استروژن تعدیل شود [۲۲]. همچنین گزارش شده است قطع استروژن در مدل اواریکتومی موش صحرایی باعث افزایش استرس اکسیداتیو قلب با افزایش سطح  $OSI$ ،  $MDA$ ،  $TOS$  و التهاب از طریق سطوح  $TNF-\alpha$  و  $NF-\kappa B$  می‌شود [۲۳]. در این مطالعه نیز مشاهده شد که اواریکتومی منجر به افزایش سایتوکین‌های التهابی  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  و افزایش سطح  $MDA$ ،  $TOS$  و کاهش

$TAC$  گردید که این فاکتورها می‌توانند با حساسیت به درد همراه باشند.

بسیاری از مطالعات، درد شدید جسمی و احشایی را در حیوانات اواریکتومی شده نشان داده‌اند. برای مثال سانوجا<sup>۱</sup> و همکاران گزارش کردند که اووفورکتومی باعث افزایش حساسیت احشایی و احساس درد مکانیکی یا پرخونی در شکم، اندام‌های تحتانی و دم در موش‌ها می‌شود [۲۰]. به طور کلی، کاهش سطح استروژن پلازما ممکن است با افزایش حساسیت به درد همراه باشد. مطالعات نشان داده‌اند که استرادیول به طور قابل توجهی پاسخ‌های ناشی از فرمالین در موش‌های اواریکتومی‌شده را کاهش می‌دهد [۲۴]. استروژن در بسیاری از مناطق مربوط به درد در سیستم عصبی مرکزی و محیطی توزیع می‌شوند و  $\beta 17$ -استرادیول می‌تواند در بسیاری از سطوح بر ایجاد و انتقال درد تأثیر بگذارد. استروژن اثر آرام بخشی بر درد نوروپاتیک دارد که احتمالاً این اثر را از طریق کانال‌های یونی دخیل در تعدیل درد اعمال می‌کند. با اینحال، تأثیرات آن بر کاهش درد و تحریک درد متناقض است [۲۲].

در میان راهکارهای موجود، ممکن است هورمون درمانی برای جلوگیری از عوارض یائسگی مانند تغییرات آستانه درد، به ویژه در نوع حاد و زودرس ذکر شود. از طرف دیگر، استروژن درمانی ممکن است منجر به عوارضی مانند سرطان پستان و سکنه مغزی شود. به همین منظور، محققان همیشه به دنبال جایگزین‌های سالم تر هستند. یکی از این راهکارها، فعالیت‌های بدنی منظم برای کاهش اثرات ناشی از کمبود استروژن می‌باشد. همچنین گیاهان یک منبع اساسی از مواد شیمیایی جدید با اثرات درمانی قابل توجه و بدون عوارض جانبی است [۲۲]. با توجه به وجود اختلاف در آستانه درد ناشی از یائسگی و همچنین بررسی تأثیر فعالیت بدنی و تجویز جنیستین

<sup>1</sup> Sanoja

به عنوان گزینه‌های احتمالی استروژن در دوران یائسگی، در مطالعه حاضر، اثرات ورزش هوازی منظم و تزریق روزانه جنیستین با دوز پایین در موش‌های اواریکتومی شده مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تجویز جنیستین و ورزش منظم شنا به مدت هشت هفته پاسخ‌های درد را کاهش می‌دهد، که نشان‌دهنده اثر ضد دردی جنیستین و ورزش است. با وجود اینکه ورزش و جنیستین توانستند باعث کاهش پاسخ درد شوند ولی نتوانستند به گروه شام برسانند و در نتیجه تفاوت معنی‌داری بین گروه شام با گروه‌های تیمار با جنیستین و ورزش به تنهایی مشاهده گردید. درحالی‌که ورزش و جنیستین به صورت ترکیبی توانستند پاسخ درد را به حدی کاهش دهند که با گروه شام تفاوت معناداری نداشت. بعلاوه اینکه از دوز پایین جنیستین در این مطالعه استفاده شده بود، احتمالاً بتوان با افزایش دوز جنیستین و یا زمان ورزش اثرات تک تک این مداخلات را در کاهش درد افزایش داد. برای بررسی مکانیسم مولکولی نتایج مشاهده شده، سطح سرمی دو عامل التهابی شامل  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  و مارکرهای دخیل در فرایند استرس اکسیداتیو شامل MDA، TAC، TOS اندازه‌گیری شد. تیمار حیوانات با شنای منظم و جنیستین به مدت هشت هفته منجر به کاهش غلظت سرمی عوامل التهابی، از جمله  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  و همچنین کاهش سطح MDA، TOS و افزایش TAC شده و همچنین تضعیف پاسخ‌های درد در آزمون‌های فرمالین و تیل- فلیک در مقایسه با موش‌های اواریکتومی شده گردید که نشان‌دهنده اثرات ضد التهابی، ضد استرس اکسیداتیو و ضد دردی جنیستین و ورزش منظم شنا می‌باشد و بنابراین این یافته‌ها می‌تواند یک روش درمانی جایگزین در کنترل سیستم درد در اختلالات یائسگی را ارائه دهد.

مطالعات متعددی تفاوت‌های جنسی در پاسخ به محرک‌های دردناک و داروهای ضد درد هم در

انسان و هم در حیوانات گزارش نموده‌اند. به طوری‌که قطع استروژن یا سرکوب گیرنده‌های استروژن منجر به از بین رفتن این تفاوت جنسی می‌شود که نشان‌دهنده نقش هورمون‌های جنسی در پاسخ درد و آستانه درد می‌باشد [۲۵]. مطابق با این یافته‌ها، در مطالعه حاضر در موش‌های اواریکتومی شده، فرمالین باعث یک پاسخ رفتاری دردناک در هر دو مرحله حاد و مزمن در حیوانات می‌شود که این امر نشان‌دهنده نقش هورمون‌های تخمدانی در موش‌های ماده بالغ در رفتار درد و احساس درد می‌باشد. درحالی‌که تجویز جنیستین و ورزش شنا به تنهایی و در ترکیب باهم منجر به کاهش پاسخ دردناک گردید. با این وجود، تجویز هر کدام به صورت تکی نتوانست Pain Score را به گروه شام برساند که احتمالاً با افزایش دوز جنیستین و زمان ورزش بتوان این اثر را القا کرد. ولی چون هدف اصلی مطالعه حاضر القاء بیشترین تاثیر با عوارض احتمالی کم بود بنابراین اثر ترکیبی جنیستین با دوز پائین و ورزش مورد بررسی قرار گرفت که نتوانستند Pain Score را به اندازه گروه شام کاهش دهند. همچنین سایتوکین‌های التهابی نیز در اثر اواریکتومی افزایش یافتند ولی در اثر تجویز جنیستین و ورزش شنا فاکتورهای التهابی کاهش یافتند. نقش سایتوکین‌ها در القا و حفظ درد نوروپاتیک در مطالعات متعددی مشخص شده است. بطوریکه آسیب به سیستم عصبی محیطی (PNS) باعث فعال شدن و جذب سلول‌های ایمنی و التهابی در محل ضایعه می‌شود. آبخارهای درون سلولی توسط عوامل بیماری‌زا، سلول‌های عصبی را از طریق واسطه‌هایی مانند  $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ، اکسید نیتریک (NO)، پروستاگلندین‌ها (PG)، فاکتور رشد عصب (NGF) و سیکلواکسیژناز ۲ فعال می‌کنند [۲۶]. آسیب عصبی همچنین تمایز زدایی سلول‌های شوان را آغاز می‌کند، که منجر به آزاد شدن برخی از واسطه‌های درد، از جمله سایتوکین‌های التهابی، NGF، PGها و آدنوزین تری فسفات (ATP) می‌شود. این واسطه‌ها ممکن است

در درد نوروپاتیک و پاتوفیزیولوژی التهاب نقش داشته باشند. در میان واسطه‌های ذکر شده،  $TNF-\alpha$  مستقیماً با آسیب سلولی و رفتار دردزا در چندین مدل آسیب عصبی ارتباط دارد [۲۶]. گزارش شده است که غلظت‌های پلاسمایی خاصی از فیتواستروژن باعث کاهش درد نوروپاتیک در موش‌ها می‌شود. طبق این گزارش، جنیستئین می‌تواند عوارض دیابت را معکوس و استرس اکسیداتیو، التهاب و عملکرد عروقی را بهبود بخشد. که نشان‌دهنده نقش بالقوه جنیستئین برای جلوگیری عوارض دیابتی از جمله نوروپاتی می‌باشد [۲۷]. همچنین مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر، مشاهده شده است که بسیاری از سایتوکین‌های پیش التهابی مانند  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1$  و  $IL-6$  توسط جنیستئین کاهش می‌یابد. جنیستئین همچنین اختلالات شناختی و التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو را نیز کاهش می‌دهد [۲۶]. مطالعه دیگری نشان داد که تزریق زیر جلدی جنیستئین در مدل تجربی یائسگی از تغییرات التهابی پانکراس مانند افزایش  $Nf-\kappa B$  و  $IL-1\beta$  و کاهش  $SIRT1$  جلوگیری می‌کند [۲۸]. همچنین نشان داده شده است که جنیستئین باعث کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب در کلیه‌ها ناشی از کمبود استروژن در موش‌های اواریکتومی شده می‌شود [۲۹]. مطالعات متعدد، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تنظیم  $NF-\kappa B$  و کاهش فعالیت آنزیم‌های ضد التهاب و سطح سایتوکین در اثر ایزوفلاون را در مدل‌های مختلف حیوانی و انسانی گزارش کرده‌اند. با این حال، از طرف دیگر، اثرات مهارکننده بالقوه ایزوفلاون بر روی سیستم ایمنی بدن و خواص سرطان‌زایی آن باعث ایجاد نگرانی در مورد خطرات مصرف ایزوفلاون می‌شود [۳۰] و بنابراین نیاز به یک ارزیابی جامع‌تر برای کشف مکانیسم‌های درگیر در پاسخ سیستم ایمنی بدن می‌باشد. علاوه بر نقش رژیم غذایی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها، نقش ورزش و فعالیت بدنی نیز در کاهش استرس اکسیداتیو بخوبی به اثبات رسیده

است. نتایج متناقضی در مورد اثرات احتمالی ورزش بر عملکرد مغز و سطح هورمون سرم و درمان جایگزینی هورمون گزارش شده است [۳۱] که این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. بطوری‌که ورزش شنا منجر به کاهش سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو و افزایش فاکتورهای آنتی‌اکسیدان و همچنین کاهش فاکتورهای التهابی گردید که البته اثر تجویز همزمان جنیستئین و ورزش قوی‌تر از اثرات تک تک این مداخلات به تنهایی بود. مطالعات نشان داده‌اند که ورزش بر مسیرهای عصبی دخیل در نورونز، سیناپتونز و آنژیونز تاثیر می‌گذارد [۳۲]. ورزش یکی از راهکارهای فیزیکی برای حفظ سلامت بدن است و از برخی عوارض اختلالات فیزیولوژیکی مانند یائسگی و چاقی ناشی از رژیم‌های پرچرب جلوگیری می‌کند. به عنوان مثال، برخی از مطالعات گزارش داده‌اند که استروژن می‌تواند میل به فعالیت بدنی را افزایش دهد [۳۳]. در عین حال، کاهش ناگهانی استروژن می‌تواند منجر به پرخوری و کاهش فعالیت بدنی و تمایل به ورزش شود [۳۴]. بنابراین توصیه می‌شود ورزش منظم روزانه بخشی از یک شیوه زندگی خوب باشد و افرادی که دارای شرایطی مانند یائسگی، چاقی یا پیری هستند باید به‌طور منظم ورزش‌های هوازی انجام دهند.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که برداشتن هر دو تخمدان باعث افزایش عوامل التهابی  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و افزایش سطوح  $MDA$  همراه با کاهش  $TAC$  می‌شود. هشت هفته ورزش منظم شنا و تجویز جنیستئین با کاهش عوامل التهابی و استرس اکسیداتیو توانست حساسیت شدید به درد را کاهش دهد. این نتایج حاکی از آن است که ترکیبی از ورزش منظم و جنیستئین یک رویکرد عملی برای بهبود وضعیت التهابی و استرس اکسیداتیو و اختلالات سیستم درد در موش‌های اواریکتومی می‌تواند مطرح باشد. در نتیجه،

**تشکر و قدردانی**

نویسندگان از مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و معاون پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان برای کمک در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند. این تحقیق با کمک مالی (شماره طرح: ۹۸۰۳۲۱۲۱۴۷) از دانشگاه علوم پزشکی همدان پشتیبانی شد.

ترکیب جنیستین و ورزش به عنوان یک درمان جایگزین طبیعی احتمالاً می‌تواند عوارض اختلالات سیستم درد ناشی از اواریکتومی و فقدان استروژن را در موش‌های صحرایی بهبود بخشد.

**References**

- 1- Shuster LT, Grossardt BR, Gostout BS, Rocca WA. Prophylactic bilateral oophorectomy jeopardizes long-term health: Menopausal medicine. *Sex Reprod Menopause*. 2010 Sep; 8:4.
- 2- Rocca WA, Bower JH, Maraganore DM, Ahlskog JE, Grossardt BR, De Andrade M, et al. Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology*. 2007 Aug; 69(11):1074-83.
- 3- Liu M, Kelley MH, Herson PS, Hurn PD. Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinol*. 2010 Jun; 35(2):127-143.
- 4- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17- $\beta$  estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Nov; 216(2):473-82.
- 5- Zhang W, Wu H, Xu Q, Chen S, Sun L, Jiao C, et al. Estrogen modulation of pain perception with a novel 17 $\beta$ -estradiol pretreatment regime in ovariectomized rats. *Biol Sex Differ*. 2020 Dec; 11(2):1-13
- 6- Vincent K, Tracey I. Hormones and their interaction with the pain experience. *Rev Pain*. 2008 Dec; 2(2):20-24.
- 7- Abraham AD, Schattauer SS, Reichard KL, Cohen JH, Fontaine HM, Song AJ, et al. Estrogen regulation of GRK2 inactivates kappa opioid receptor signaling mediating analgesia, but not aversion. *J Neurosci*. 2018 Sep; 38(37):8031-8043.
- 8- Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013 Mar; 19(3):197-209.
- 9- Yue W, Wang JP, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer*. 2010 Oct; 127(8):1748-1757.
- 10- Henderson VW, Lobo RA. Hormone therapy and the risk of stroke: perspectives 10 years after the Women's Health Initiative trials. *Climacteric*. 2012 May; 15(3):229-34.
- 11- Domínguez-López I, Yago-Aragón M, Salas-Huetos A, Tresserra-Rimbau A, Hurtado-Barroso S. Effects of dietary phytoestrogens on hormones throughout a human lifespan: A review. *Nutrients*. 2020 Aug; 12(8):2456.
- 12- Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res*. 2003 Sep; 17(8):845-69.
- 13- Menze ET, Esmat A, Tadros MG, Abdel-Naim AB, Khalifa AE. Genistein improves 3-NPA-induced memory impairment in ovariectomized rats: impact of its antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase modulatory properties. *PLoS One*. 2015 Feb; 10(2):e0117223.
- 14- Sun L, Li Y, Jia X, Wang Q, Li Y, Hu M, et al. Neuroprotection by IFN- $\gamma$  via astrocyte-secreted IL-6 in acute neuroinflammation. *Oncotarget*. 2017 Jun; 8(25):40065-40078.
- 15- Lima LV, Abner TSS, Sluka KA. Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. *J Physiol*. 2017 Jul; 595(13):4141-4150.
- 16- Habibi P, Alihemmati A, NourAzar A, Yousefi H, Mortazavi S, Ahmadiasl N. Expression of the Mir-133 and Bcl-2 could be affected by swimming training in the heart of ovariectomized rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2016 Apr; 19(4):381-7.

- 17- Habibi P, Babri S, Ahmadiasl N, Yousefi H. Effects of genistein and swimming exercise on spatial memory and expression of microRNA 132, BDNF, and IGF-1 genes in the hippocampus of ovariectomized rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2017 Aug; 20(8):856-862.
- 18- Daghigh F, Alihemmati A, Karimi P, Habibi P, Ahmadiasl N. Genistein preserves the lungs of ovariectomized diabetic rats: addition to apoptotic and inflammatory markers in the lung. *Iran J Basic Med Sci.* 2017 Dec; 20(12):1312-1317.
- 19- Li LH, Wang ZC, Yu J, Zhang YQ. Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. *PloS one.* 2014 Apr; 9(4):e94312.
- 20- Berkley KJ, McAllister SL, Accius BE, Winnard KP. Endometriosis-induced vaginal hyperalgesia in the rat: effect of estropause, ovariectomy, and estradiol replacement. *Pain.* 2007 Nov;132 Suppl 1(Suppl 1):S150-S159.
- 21- Shir Y, Campbell JN, Raja SN, Seltzer Z. The correlation between dietary soy phytoestrogens and neuropathic pain behavior in rats after partial denervation. *Anesth Analg.* 2002 Feb; 94(2):421-6.
- 22- Xu ZZ, Chen QY, Deng SY, Zhang M, Tan CY, Wang Y, et al. 17 $\beta$ -estradiol attenuates neuropathic pain caused by spared nerve injury by upregulating CIC-3 in the dorsal root ganglion of ovariectomized rats. *Front Neurosci.* 2019 Nov; 13:1205.
- 23- Zhou H, Zhang C, Ni J, Han X. Prevalence of cardiovascular risk factors in non-menopausal and postmenopausal inpatients with type 2 diabetes mellitus in China. *BMC Endocr Disord.* 2019 Oct; 19:98.
- 24- Greaves E, Horne AW, Jerina H, Mikolajczak M, Hilferty L, Mitchell R, et al. EP 2 receptor antagonism reduces peripheral and central hyperalgesia in a preclinical mouse model of endometriosis. *Sci Rep.* 2017 Mar; 7:44169.
- 25- Li L, Fan X, Warner M, Xu XJ, Gustafsson JÅ, Wiesenfeld-Hallin Z. Ablation of estrogen receptor  $\alpha$  or  $\beta$  eliminates sex differences in mechanical pain threshold in normal and inflamed mice. *Pain.* 2009 May;143(1-2):37-40.
- 26- Valsecchi AE, Franchi S, Panerai AE, Sacerdote P, Trovato AE, Colleoni M. Genistein, a natural phytoestrogen from soy, relieves neuropathic pain following chronic constriction sciatic nerve injury in mice: anti-inflammatory and antioxidant activity. *J Neurochem.* 2008 Oct; 107(1):230-40.
- 27- Valsecchi AE, Franchi S, Panerai AE, Rossi A, Sacerdote P, Colleoni M. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur J Pharmacol.* 2011 Jan; 650(2-3):694-702.
- 28- Yousefi H, Alihemmati A, Karimi P, Alipour MR, Habibi P, Ahmadiasl N. Effect of genistein on expression of pancreatic SIRT1, inflammatory cytokines and histological changes in ovariectomized diabetic rat. *Iran J Basic Med Sci.* 2017 Apr; 20(4):423-429.
- 29- Javani G, Alihemmati A, Habibi P, Yousefi H, Karimi P, Ebraheimi V, et al. The effects of genistein on renal oxidative stress and inflammation of ovariectomized rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2019 Nov; 14(4):e57149.
- 30- Yu J, Bi X, Yu B, Chen D. Isoflavones: anti-inflammatory benefit and possible caveats. *Nutrients.* 2016 Jun; 8(6):361.
- 31- Molaei A, Hatami H, Dehghan G, Sadeghian R, Khajehnasiri N. Synergistic effects of quercetin and regular exercise on the recovery of spatial memory and reduction of parameters of oxidative stress in animal model of Alzheimer's disease. *EXCLI J.* 2020 May; 19:596-612.
- 32- Quigley A, MacKay-Lyons M, Eskes G. Effects of exercise on cognitive performance in older adults: A narrative review of the evidence, possible biological mechanisms, and recommendations for exercise prescription. *J Aging Res.* 2020 May;2020:1407896.
- 33- Loprinzi PD, Ponce P, Zou L, Li H. The counteracting effects of exercise on high-fat diet-induced memory impairment: a systematic review. *Brain Sci.* 2019 Jun; 9(6):145.
- 33- Bowen RS, Turner MJ, Lightfoot JT. Sex hormone effects on physical activity levels. *Sports Med.* 2011 Jan; 41(1):73-86.
- 34- Butera PC. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav.* 2010 Feb;99(2):175-80.