



## مطالعه تأثیر عصاره الکلی بذر کتان و تمرین هوازی بر پارامترهای پوکی استخوان در موش صحرایی اواریکتومی شده

سید زانبار اطهری: دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
محمدرضا نصیرزاده: استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران  
میرعلیرضا نورآذر: استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران (\* نویسنده مسئول) Noura347@yahoo.com

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

اواریکتومی،  
بذر کتان،  
پوکی استخوان،  
تمرین هوازی،  
موش صحرایی

**زمینه و هدف:** کاهش استروژن زنان بعد از یائسگی باعث کاهش توده استخوانی می‌شود. دانه کتان سرشار از ترکیبات فیتواستروژنی است که با افزایش گلوبولین متصل شونده به هورمون جنسی در کاهش عوارض بعد از یائسگی زنان نقش دارد. همچنین، ورزش روشی مطمئن و مؤثر برای جلوگیری از تخریب استخوان در زنان یائسه می‌باشد. هدف از این بررسی ارزیابی تأثیر مصرف عصاره الکلی بذر کتان و تمرین هوازی بر پارامترهای پوکی استخوان در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده می‌باشد.

**روش کار:** در این مطالعه از ۳۶ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار، با میانگین وزن  $250 \pm 25$  گرم استفاده شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه مساوی شامل: ۱- سالم شاهد، ۲- شم (شاهد جراحی)، ۳- گروه اواریکتومی شامل موش‌هایی که تخم‌اندازشان به روش جراحی برداشته شد، ۴- اواریکتومی به همراه عصاره بذر کتان که به مدت ۸ هفته روزانه به مقدار  $400 \text{ mg/kg}$  عصاره به‌صورت گاواژ دریافت کردند، ۵- اواریکتومی به همراه ورزش که به مدت ۸ هفته ورزش کردند، ۶- اواریکتومی به همراه ورزش و عصاره بذر کتان تقسیم شدند. در پایان دوره نمونه خون اخذ شده و سطوح سرمی هورمون‌های پاراتورمون و استئوکلسین و همچنین آلکالین فسفاتاز و کلسیم اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی در سطح  $p < 0.05$  مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** غلظت سرمی هورمون‌های پاراتورمون و استئوکلسین به‌طور معنی‌داری کاهش و آلکالین فسفاتاز و کلسیم در گروه‌های تیمار نسبت به گروه اواریکتومی شده به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف عصاره دانه کتان به همراه انجام ورزش هوازی باعث کاهش غلظت سرمی هورمون پاراتورمون و افزایش آلکالین فسفاتاز در موش صحرایی اواریکتومی شده می‌شود.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Athari SZ, Nasirzadeh M, Nourazar MA. Study on the Effect of Alcoholic Extract of Flaxseed and Aerobic Exercise on Osteoporosis Parameters on Ovariectomized Rats. Razi J Med Sci. 2022;29(8):267-277.

\*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

## Study on the Effect of Alcoholic Extract of Flaxseed and Aerobic Exercise on Osteoporosis Parameters on Ovariectomized Rats

**Seyed Zanyar Athari:** PhD Student of Medical Physiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

**Mohammadreza Nasirzadeh:** Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz medical sciences branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

**Mir Alireza Nourazar:** Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz medical sciences branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran (\* Corresponding author) [Noura347@yahoo.com](mailto:Noura347@yahoo.com)

### Abstract

**Background & Aims:** Osteoporosis is a systemic skeletal disease associated with decreased bone mass and loss of bone tissue structure, resulting in increased susceptibility to fractures. Depending on the etiological factors, the disease may occur in primary (menopausal and aging) and secondary forms. One of the important etiologies of this disease is estrogen deficiency, in which estrogen deficiency is considered the main determinant of bone destruction in postmenopausal women. One of the major causes of this disease is estrogen deficiency, in which estrogen deficiency is considered the main cause of bone destruction in postmenopausal women (1, 2). The flax plant, with the scientific name of *Linum usitatissimum*, is an annual plant of the genus *Linaceae* that grows like a plant in the climatic conditions of Iran (10). Flaxseed is rich in phytoestrogenic compounds. Flaxseed phytoestrogens reduce post-menopausal complications in women by increasing sex hormone-binding globulin (SHBG) (11). Flaxseed is also a rich source of various phenols such as lignans, phenolic acids, flavonoids, phenylpropanoids, and tannins, known as a rich source of natural antioxidants (12). Regular exercise and physical activity can prevent diseases such as sarcopenia, obesity, and mitochondrial dysfunction, which are the main drivers of oxidative stress and inflammation in aging (13). It has also been suggested that exercise is a safe and effective way to prevent bone destruction in postmenopausal women (14). Given that ovariectomized rats have many similarities in the pathophysiological mechanisms of this complication with the human model, it is a suitable model for studying human osteoporosis (2, 16). On the other hand, since flaxseed has antioxidant and phytoestrogenic properties and exercise also leads to the prevention and treatment of osteoporosis complications, this study aimed to investigate the effect of aerobic exercise and flaxseed extract on osteoporosis index parameters in ovariectomized rats.

**Methods:** The present study is an experimental intervention. For the study, 36 adult female Wistar rats with an average weight of  $250 \pm 20$  prepared from the Laboratory Animal Breeding Center of the Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, were used. Rats were randomly divided into 6 equal groups, including control, sham (only opening and closing the abdomen), ovariectomy (Ovx), ovariectomy + Flaxseed extract (Ovx + Flaxseed), ovariectomy + aerobic exercise (Ovx + Exercise), and ovariectomy + aerobic exercise + flaxseed extract groups (Ovx + Flaxseed + Exercise) were divided. The treatment protocol was started after ovariectomy surgery on the study groups and ten days postoperative recovery (17). The ovariectomy + Flaxseed extract and ovariectomy + aerobic exercise + flaxseed extract groups received 400 mg/kg of flaxseed extract daily by gavage. Rats in the control group and the ovariectomized group received the same volume of normal saline by gavage. In the exercise groups, aerobic exercise was performed on a treadmill for five days each week for eight weeks.

### Keywords

Aerobic exercise,  
Flaxseed,  
Osteoporosis,  
Ovariectomy,  
Rat

Received: 03/09/2022

Published: 05/11/2022

The training process was incremental. Groups that did not practice were placed on the treadmill for the same amount of time as the exercise groups while the machine was off (18). After sacrificing and taking blood samples from rats, the serum was immediately separated by centrifugation (4°C) at 1500 rpm for 15 minutes. The serum was transferred to a freezer at 20 °C and stored. Serum alkaline phosphatase (ALP) levels were measured using an automated analyzer. Serum calcium concentration was measured using the modified atomic absorption method of 180-80 Ziman using a spectrophotometric device. Serum osteocalcin was measured using a Radioimmunoassay kit, and parathormone (PTH) was measured using an ELISA kit. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test at the level of  $p < 0.05$  by GraphPad software.

**Results:** Serum calcium and PTH concentrations in ovariectomy mice were significantly lower than controls ( $p < 0.05$ ). Also, serum concentrations of osteocalcin and ALP in mice in the ovariectomy group were significantly higher than in the control group ( $p < 0.05$ ). Serum concentrations of parathyroid hormone and osteocalcin decreased significantly, and alkaline phosphatase and calcium in the treated groups increased significantly compared to the ovariectomized group ( $p < 0.05$ ). The best results were obtained in the Ovx + Flaxseed + Exercise group.

One of the sites of the effect of PTH is bone tissue, which increases the uptake of calcium and phosphorus from bone tissue (22). A study has shown that ovariectomized rats have a high aerobic capacity and are also more resistant to disease, and have a reduced response to adverse environmental conditions (22). Xiaoli et al. showed that ovariectomy significantly increased osteocalcin compared to the sham group (23). These results are consistent with the results of the present study. In another study, Qi and Zheng stated that ovariectomy in rats resulted in a significant increase in serum osteocalcin levels, which was consistent with the results of our study (24). The researchers also said that treating osteoporotic rats after ovariectomy with phytoestrogens such as genistein and silicon would improve osteocalcin factor, which is consistent with the present study (24). In the present study, decreased osteocalcin levels after ovariectomy improved after treatment with flaxseed extract due to its phytoestrogenic properties. A study by jian feng et al. showed that the serum concentration of ALP enzyme in the ovariectomy group increased significantly. ALP is produced by osteoblasts and is essential for bone mineralization, which is consistent with our study (21). In another study, Qi and Zheng stated that ovariectomy significantly increased serum ALP levels, which was in line with the results of our study. Also, treatment with phytoestrogens will improve the ALP factor, which is in line with the present study (24). In the present study, elevated ALP improved after ovariectomy after treatment with flaxseed extract. Lihui et al. found that exercise in ovariectomized rats increased bone density by reducing bone resorption and increased bone formation (26). Decreased serum concentrations of PTH and osteocalcin and increased serum concentrations of calcium and ALP in the treated groups compared to the ovariectomy group showed an improvement in the condition in the treated groups compared to the ovariectomy group.

**Conclusion:** According to the results of the present study, it can be concluded that the combination of aerobic exercise and flaxseed extract has improved the complications of ovariectomy and estrogen deficiency in the studied rats. However, more research is needed to generalize the results in humans and to find the effective composition in the extract.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Athari SZ, Nasirzadeh M, Nourazar MA. Study on the Effect of Alcoholic Extract of Flaxseed and Aerobic Exercise on Osteoporosis Parameters on Ovariectomized Rats. Razi J Med Sci. 2022;29(8):267-277.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

پوکی استخوان (Osteoporosis) یک بیماری اسکلتی سیستمیک است که با کاهش توده‌ی استخوانی و از بین رفتن ساختار بافتی استخوان همراه است و نتیجه‌ی آن افزایش استعداد ابتلا به شکستگی‌ها می‌باشد. این بیماری با توجه به فاکتورهای اتیولوژیک، ممکن است به دو صورت اولیه (در یائسگی و پیری) و ثانویه رخ دهد. یکی از اتیولوژی‌های مهم رخداد این بیماری، نقصان استروژن می‌باشد که کمبود استروژن به‌عنوان عامل اصلی تعیین‌کننده تخریب استخوان در زنان یائسه در نظر گرفته می‌شود. یائسگی منجر به افزایش فرآیند تخریب و تولید در استخوان و از طرفی عدم تعادل بین این فرآیند تشکیل و جذب در استخوان و از بین رفتن آن می‌شود (۱،۲). از دیگر عوامل ایجادکننده این عارضه می‌توان به تغییرات ناشی از افزایش سن، کاهش مصرف کلسیم در رژیم غذایی (۳)، سبک زندگی، خصوصیات ژنتیکی و هورمونی (۴،۵) و همچنین کاهش در فعالیت بدنی و ضعف عضلانی اشاره کرد که میزان تخریب استخوان را افزایش می‌دهد (۶). با توجه به عوامل هورمونی و نقصان استروژن در زنان یائسه، کاهش شدید توده استخوانی مشاهده می‌شود، بنابراین شایع بودن پوکی استخوان در زنان در مقایسه با مردان توجیه می‌شود (۳). از عوارض یائسگی می‌توان به بیماری‌زایی مبهم آن، کاهش چشمگیر کیفیت زندگی، بروز بالای پوکی استخوان، هزینه‌های مالی و مرگومیر بالا اشاره کرد که این دلایل نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه را ضروری می‌کند (۷). امروزه از هورمون درمانی جایگزین در جهت کاهش این عوارض و جلوگیری از ریزش استخوان و کاهش بروز شکستگی‌های اسکلتی در برخی از زنان یائسه استفاده می‌شود. با این حال، طبق نتایج حاصل از پژوهش بر روی زنان تیمار شده با هورمون درمانی جایگزین مشخص شده است که استفاده طولانی‌مدت از این روش خطر ابتلا به سرطان سینه، سرطان آندومتر، حوادث ترومبوآمبولیک و خونریزی واژن را افزایش می‌دهد (۱). در مطالعه‌ی مهاجری و همکاران در سال ۲۰۰۷ تغییرات هیستوپاتولوژی ناشی از استئوپروز متعاقب اواریکتومی در موش‌های صحرایی را بررسی کردند و وجود استئوپروز را متعاقب اواریکتومی با بررسی استخوان‌های

درشتنی و ران تأیید کردند (۸). تحقیقات Blum و همکاران در سال ۲۰۰۳ در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده مبتلا به استئوپروز مشخص نموده است که جایگزین نمودن هورمون استروژن در این موش‌ها مانع از پوکی استخوان شده و یا باعث کاهش شدت آن می‌گردد (۹). با توجه به بروز عوارض متعدد در پی مصرف داروهای شیمیایی و اغلب جبران‌ناپذیر آن‌ها از یک سو و همچنین فراوانی و دسترس‌ی بسیار آسان به گونه‌های بومی گیاهان داروئی و استقبال مردم به استفاده از داروهای سنتی، امروزه گرایش برای تولید داروهای جدید که مؤثرتر، قوی‌تر و سازگارتر با بدن موجودات زنده باشد بیشتر شده است.

گیاه کتان با نام علمی لینوم اوسیتاتیسیموم (Linum Usitatissimum)، گیاهی یک‌ساله است از تیره لینه آسه (Linaceae) که در شرایط آب و هوایی ایران به شکل بوته‌ای رشد می‌کند (۱۰). دانه کتان سرشار از ترکیبات فیتواستروژنی است. ترکیبات فیتواستروژن دانه کتان با افزایش گلوبولین متصل شونده به هورمون‌های جنسی (Sex Hormone Binding Globulin: SHBG) در کاهش عوارض بعد از یائسگی زنان نقش دارد (۱۱). همچنین دانه کتان یک منبع غنی از انواع مختلف فنل‌ها مانند لیگنان، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و تانن‌ها می‌باشد که به‌عنوان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته می‌شود (۱۲). ورزش و فعالیت بدنی منظم می‌تواند از اثرات مخرب پیری مانند سارکوپنی، چاقی و اختلال عملکرد میتوکندری که از محرک‌های اصلی استرس اکسیداتیو و التهاب در پیری هستند، پیشگیری کند (۱۳). همچنین بیان شده است که ورزش روشی مطمئن و مؤثری برای جلوگیری از تخریب استخوان در زنان یائسه می‌باشد (۱۴). طی مطالعه‌ای که حجتی و همکاران انجام دادند، بیان کردند که انجام فعالیت‌های ورزشی منجر به بهبود وضعیت استحکام استخوان‌ها در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده مدل استئوپروز شده است (۱۵). با توجه به اینکه موش‌های اواریکتومی شده به دلیل شباهت‌های بسیاری که در مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک این عارضه با مدل انسانی دارند، مدل مناسبی برای بررسی پوکی استخوان انسان محسوب می‌شود (۱۶، ۲). از طرفی با توجه به اینکه بذر کتان

یک هفته و سازگاری حیوانات به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه مساوی شامل گروه کنترل، گروه شام (Sham) (فقط باز کردن شکم و بستن مجدد آن)، گروه اواریکتومی (Ovx)، گروه اواریکتومی-عصاره بذر کتان (Ovx+Flaxseed)، گروه اواریکتومی-تمرین (Ovx+Exercise) و گروه اواریکتومی-تمرین-عصاره بذر کتان (Ovx+Flaxseed+Exercise) تقسیم شدند.

**مدل‌سازی:** بر روی گروه‌های ۲ تا ۵ جراحی اواریکتومی صورت گرفت و ۱۰ روز پس از جراحی و پس از بهبود کامل آماده‌ی انجام آزمایش شدند (۱۷). حیوانات در این مطالعه کلیه‌ی ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی، مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانش‌گاه آزاد اسلامی تبریز بود. جهت جلوگیری از تورش (Bias) در تحقیق، مراحل مختلف مطالعه به صورت دو سو بی‌خبر انجام شد. بدین معنی که کار آزمایشی به نحوی برنامه‌ریزی شد که نه تیمارگر و نه آزمایشگاه، در هیچ‌یک از مراحل متوجه گروه‌های تخصیص‌یافته مورد (تیمار) و شاهد نبودند.

**برنامه ورزش:** در گروه‌های تمرین، به مدت ۸ هفته، هر هفته به مدت ۵ روز بر روی نوارگردان تمرین هوازی اجباری انجام شد. روند تمرین به صورت افزایشی بوده و جزئیات برنامه تمرین موش‌ها در جدول ۱ آورده شده است. جهت وادار کردن حیوانات به دویدن از میله‌های

دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فیتواستروژنیک بوده و ورزش نیز منجر به پیشگیری و درمان عوارض پوکی استخوان می‌شود، فرض بر این است که تمرین هوازی و عصاره بذر کتان بر پارامترهای شاخص پوکی استخوان در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده پیر تأثیر مثبت دارد. در هر صورت با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تأثیر عصاره الکلی بذر کتان و تمرین هوازی بر پارامترهای پوکی استخوان در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده پیر مشاهده نشده است، مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی تأثیر عصاره الکلی بذر کتان و تمرین هوازی بر پارامترهای پوکی استخوان در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده پیر طراحی و اجرا گردید.

## روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی است و با تایید کمیته اخلاق با شماره IR.IAU.TABRIZ.REC.1401.078 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز اجرا گردید. جهت انجام تحقیق، تعداد ۳۶ سر موش صحرایی ماده بالغ و یسه‌تار با میانگین وزنی  $250 \pm 20$  گرم تهیه‌شده از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، استفاده شد. موش‌ها در محیط با دمای  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. همچنین جیره غذایی یکسان و آب آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت و پس از گذشت

جدول ۱- جزئیات برنامه تمرین هوازی با استفاده از نوارگردان به اجرا درآمده

سرعت (دقیقه/متر)	زمان (دقیقه)		سرعت (دقیقه/متر)	زمان (دقیقه)		گرم کردن
	گرم کردن	تمرین		گرم کردن	تمرین	
۵	۵	۵	۲	۵	۳	هفته اول
۵	۱۰	۵	۲	۱۰	۳	هفته دوم
۵	۱۵	۵	۲	۱۵	۳	هفته سوم
۵	۲۰	۵	۲	۲۵	۳	هفته چهارم
۵	۲۵	۵	۲	۳۵	۳	هفته پنجم
۵	۲۵	۵	۲	۴۵	۳	هفته ششم
۵	۲۵	۵	۲	۵۵	۳	هفته هفتم
۵	۲۵	۵	۲	۵۵	۳	هفته هشتم

شوک الکتریکی به میزان ۳ میلی‌آمپر استفاده شد. شیب دستگاه در طول تمرین صفر درجه بود. گروه‌هایی که تمرین نداشتند نیز همانند گروه‌های تمرین، در حالی که دستگاه خاموش بود به همان مدت روی نوارگردان قرار داده شدند (۱۸).

گروه‌های تیمار با عصاره بذر کتان، روزانه به مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره بذر کتان به‌صورت گاواژ دریافت کردند (۱۹). موش‌های گروه کنترل و گروه اواریکتومی شده هم‌حجم عصاره، نرمال سالیان به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

بذر خالص کتان پس از تهیه و تأیید توسط گروه فارماکونوزی (Pharmacognosy) دانشگاه، مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه عصاره بذر کتان، ابتدا دانه‌ها کاملاً آسیاب شد و ۱۲۰ گرم از پودر حاصله پس از اضافه کردن ۵۰۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر (Petroleum Ether) (25:6, V:W) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق به‌وسیله همزن مغناطیسی چربی زدایی شد و سپس مخلوط با یک توری استیل با قطر منافذ ۰/۵ میلی‌متر صاف گردید. اتر باقی‌مانده در پودر چربی زدایی شده به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق بخار شد و حدود ۱۰۰ گرم از پودر چربی زدایی شده در محلولی شامل ۶۰۰ میلی‌لیتر اتانول، آب مقطر و سدیم هیدروکسید (Sodium hydroxide) (NaOH)، ۱ مولار به ترتیب نسبت حجمی ۴:۱:۱ به مدت ۲ ساعت در همزن مغناطیسی مخلوط گردید. سپس اسیدسیتریک گلاسیال (Glacial citric acid) تا pH=۶ رسید و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا پلی ساکاریدهای محلول در آب و پروتئین‌ها جداسازی شود (۲۰).

**تهیه عصاره:** برای تهیه عصاره از متد Perretti و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد (۲۰). بذر خالص کتان از یک عطاری معتبر در تبریز خریداری شد و پس از تأیید توسط گروه فارماکونوزی دانشگاه تبریز مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه عصاره بذر کتان ابتدا دانه‌ها کاملاً آسیاب شده و ۱۲۰ گرم از پودر حاصله پس از اضافه کردن ۵۰۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر (سیگما، آلمان) (V:W, ۶:۲۵) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق

به‌وسیله همزن مغناطیسی چربی زدایی شد و سپس مخلوط با یک‌طوری مشی استیل با قطر منافذ ۰/۵ میلی‌متر صاف شد و اتر باقی‌مانده در پودر چربی زدایی شده به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق بخار شد و حدود ۱۰۰ گرم از پودر چربی زدایی شده در محلولی شامل ۶۰۰ ml اتانول، آب مقطر و NaOH، ۱ M به ترتیب نسبت حجمی ۱:۱۴ به مدت ۲ ساعت در همزن مغناطیسی مخلوط گردید و سپس اسیدسیتریک گلاسیل تا pH=۶ رسید و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با شتاب ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا پلی ساکاریدهای محلول در آب و پروتئین‌ها جداسازی شود (۲۰).

**مطالعه بیوشیمیایی:** پس از آسان‌کشی و اخذ نمونه خون از موش‌ها، بلافاصله با سانتریفیوژ (۴ درجه سلسیوس) در ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سرم آن جدا شد. سرم به فریزر با دمای ۲۰ درجه سلسیوس منتقل و نگهداری شد. سطح سرمی فسفاتاز کلیایی (ALP) با استفاده از کیت‌های آزمایش تجاری (Roche Diagnostic، میلان، ایتالیا) با استفاده از دستگاه آنالیز خودکار سنجیده شد. غلظت کلسیم در سرم با استفاده از روش جذب اتمی اصلاح‌شده ۱۸۰-۸۰-زیمان با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتری (LEEMAN- (LABS, Hudson, MA, USA) اندازه‌گیری شد. استئوکلسین سرم با استفاده از کیت پارا تور مون (PTH) با استفاده از کیت الیزا (Immutopics Inc., San Clemente, CA, USA) اندازه‌گیری شد.

**آنالیز آماری:** برای تحلیل داده‌های حاصله از نرم‌افزار GraphPad نسخه ۸ استفاده شد. داده‌های به‌دست‌آمده کمی، به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف در سطح معنی‌دار  $p < 0/05$  معنی‌دار تلقی شد.

## یافته‌ها

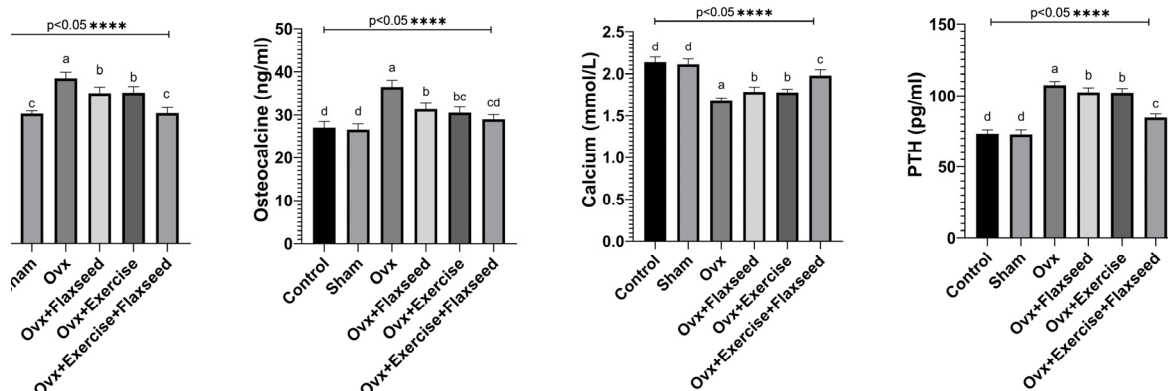
مطابق جدول ۲ و نمودار ۱، میانگین غلظت سرمی



**جدول ۲- میانگین میزان شاخص‌های پوکی استخوان در سرم موش‌های صحرایی ماده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (Mean±SD).**

Parathyroid hormone (pg/ml)	Calcium (mmol/L)	Osteocalcin (ng/ml)	Alkaline Phosphatase (U/L)	
۷۳/۲±۳۷/۶ <sup>d</sup>	۲/۰±۱۳/۰۵ <sup>d</sup>	۲۷/۱±۱۱/۳۳ <sup>d</sup>	۸۹/۱±۶/۵۷ <sup>c</sup>	کنترل (Control)
۷۲/۹۴±۳/۰۵ <sup>d</sup>	۲/۰±۱۰/۰۶ <sup>d</sup>	۲۶/۱±۶۶/۲۳ <sup>d</sup>	۱±۸۲/۹۰/۹۲ <sup>c</sup>	شم (Sham)
۱۰۷/۴±۲/۴۷ <sup>a</sup>	۱/۰±۶۸/۰۳ <sup>a</sup>	۳۶/۱±۵۸/۴۵ <sup>a</sup>	۱۱۵/۳±۵/۸۲ <sup>a</sup>	اواریکتومی (Ovx)
۱۰۲/۵±۲/۹۳ <sup>b</sup>	۱/۰±۷۹/۰۵ <sup>b</sup>	۳۱/۱±۳۸/۳۷ <sup>b</sup>	۱۰۵/۴±۲/۰۸ <sup>b</sup>	اواریکتومی + عصاره کتان (Ovx+Flaxseed)
۱۰۲/۲±۲۰/۸۳ <sup>b</sup>	۱/۰±۷۸/۰۳ <sup>b</sup>	۳۰/۱±۵۷/۲۸ <sup>bc</sup>	۱۰۵/۴±۶/۰۷ <sup>b</sup>	اواریکتومی + ورزش (Ovx+Exercise)
۸۴/۶۵±۲/۴۳ <sup>c</sup>	۱/۰±۹۸/۰۶ <sup>c</sup>	۲۹/۱±۰۰/۰۳ <sup>cd</sup>	۹۱/۳±۲۲/۶۴ <sup>c</sup>	اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان (Ovx+Exercise+Flaxseed)

سطح معنی‌دار  $p < 0.05$  در نظر گرفته شده است. حروف نامشابه در هر ردیف نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.



**نمودار ۱- مقایسه میانگین میزان شاخص‌های پوکی استخوان در سرم موش‌های صحرایی ماده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (Mean±SD).**

سطح معنی‌دار  $p < 0.05$  در نظر گرفته شده است. حروف نامشابه در هر ردیف نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.

از گروه‌های کنترل و اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). غلظت سرمی ALP در موش‌های گروه اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان به‌طور معنی‌داری از گروه اواریکتومی بیشتر بوده ( $p < 0.05$ ), اما تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. غلظت سرمی Osteocalcin در موش‌های گروه اواریکتومی + عصاره کتان تفاوت آماری معنی‌داری با گروه اواریکتومی + ورزش نداشت، درحالی‌که به‌طور معنی‌داری از گروه اواریکتومی کمتر بوده ولی به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل و اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). غلظت سرمی Osteocalcin در موش‌های

ALP، Osteocalcin، Calcium و PTH در بین موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل و شم هیچ تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. غلظت سرمی Calcium و PTH در موش‌های گروه اواریکتومی به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل کمتر بود ( $p < 0.05$ ). همچنین غلظت سرمی ALP و Osteocalcin در موش‌های گروه اواریکتومی به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). غلظت سرمی ALP در موش‌های گروه اواریکتومی + عصاره کتان هیچ تفاوت آماری معنی‌داری با گروه اواریکتومی + ورزش نداشت، درحالی‌که به‌طور معنی‌داری از گروه اواریکتومی کمتر و به‌طور معنی‌داری

توده استخوانی و ساختار آن می‌شود. استروژن می‌تواند با تأثیر بر غده پاراتیروئید باعث افزایش ترشح هورمون پاراتورمون از این غده شود. هورمون پاراتورمون نیز در کلیه بر روی آنزیم آلفا یک هیدروکسیلاز اثر کرده و باعث تولید متابولیت فعال ویتامین D (۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول) می‌شود. این ماده در روده اثر کرده و میزان جذب کلسیم را افزایش می‌دهد. در زمانی که استروژن بدن کاهش پیدا می‌کند به دلیل کاهش میزان متابولیت فعال ویتامین D، جذب کلسیم دچار مشکل شده و متعاقب کاهش میزان سرمی کلسیم، میزان هورمون PTH (Parathyroid hormone) افزایش می‌یابد تا بتواند میزان کلسیم سرمی را به حالت نرمال درآورد. یکی از جایگاه‌های اثر PTH، بافت استخوانی است که برداشت کلسیم و فسفر را از بافت استخوان افزایش می‌دهد (۲۲). طی مطالعه‌ای نشان داده شده است که در کل، موش‌های صحرایی اواریکتومی شده ظرفیت هوازی بالایی دارند و در برابر بیماری‌ها مقاومت بیشتری داشته و نسبت به شرایط بد محیطی پاسخ کاهشی نشان می‌دهند (۲۲). مطالعه صورت گرفته توسط Xiaoli و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده است که اواریکتومی سبب افزایش معنی‌دار استئوکلسین نسبت به گروه شام شده است. این نتایج با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. استئوکلسین یک پروتئین کوچک غیر کلاژنی زمینه‌ای است که از سنتز سلول جدید مشتق شده و زمانی که بین تشکیل و باز جذب استخوان تعادلی وجود ندارد شاخص اختصاصی تشکیل استخوانی است. افزایش سرمی استئوکلسین بازتابی از افزایش فعالیت استئوبلاستی و جایگزینی استخوانی است. افزایش سرمی استئوکلسین ناشی از افزایش بازچرخش استخوانی به دلیل نقص استروژنی است (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر Qi و Zheng بیان کردند که اواریکتومی در موش‌های صحرایی منجر به افزایش معنی‌داری در سطح سرمی استئوکلسین می‌شود که همسو با نتایج مطالعه ما بود. همچنین این محققین بیان کردند که تیمار موش‌های اوستئوپروتیک متعاقب اواریکتومی با مواد فیتواستروژنیک همچون جنی‌ستین و سیلیکون منجر به بهبود فاکتور استئوکلسین خواهد

گروه اواریکتومی + ورزش هیچ تفاوت آماری معنی‌داری با گروه اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان نداشت. غلظت سرمی این فاکتور در موش‌های گروه اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان به‌طور معنی‌داری از گروه اواریکتومی کمتر بوده ( $p < 0.05$ )، درحالی‌که هیچ تفاوت آماری معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. میانگین غلظت سرمی Calcium در موش‌های گروه اواریکتومی + عصاره کتان هیچ تفاوت آماری معنی‌داری با گروه اواریکتومی + ورزش نداشت، درحالی‌که به‌طور معنی‌داری از موش‌های گروه اواریکتومی بیشتر و به‌طور معنی‌داری از گروه‌های کنترل و اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان کمتر بود ( $p < 0.05$ ). غلظت سرمی Calcium در گروه اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان به‌طور معنی‌داری از گروه اواریکتومی بیشتر بوده اما به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل کمتر بود ( $p < 0.05$ ). غلظت سرمی PTH در موش‌های گروه اواریکتومی به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل کمتر بود ( $p < 0.05$ ). این فاکتور در موش‌های گروه اواریکتومی + عصاره کتان به‌طور معنی‌داری از گروه اواریکتومی کمتر بوده ولی این مقدار به حد نرمال نرسید ( $p < 0.05$ )، همچنین این داده‌ها هیچ تفاوت آماری معنی‌داری با گروه اواریکتومی + ورزش نداشت. میانگین سرمی PTH در گروه اواریکتومی + ورزش + عصاره کتان به‌طور معنی‌داری از گروه‌های اواریکتومی + عصاره کتان و اواریکتومی + ورزش کمتر بوده ولی به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود ( $p < 0.05$ ).

## بحث

به‌طور روزافزونی مسائل مرتبط با سلامتی اهمیت بیشتری پیدا می‌کنند و کیفیت زندگی میلیون‌ها انسان را در سرتاسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهند. یائسگی و جراحی اواریکتومی باعث کاهش سریع دانسیته استخوانی می‌شود (۲۱). به‌طور گسترده‌ای از موش صحرایی اواریکتومی شده به‌عنوان مدلی برای زنان یائسه استفاده می‌شود. به دنبال اواریکتومی کمبود استروژن با غلبه فعالیت استئوکلاستی بر استئوبلاستی برداشت استخوانی را تسریع می‌کند که منجر به تحلیل



گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه اواریکتومی شده به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. این موضوع با افزایش غلظت سرمی کلسیم در گروه‌های عصاره، ورزش و ترکیب هر دو همخوانی دارد. در مطالعه انجام‌شده توسط Erben و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده‌شده است که تجویز Risedronate (یک ماده پلی‌فنل با ویژگی آنتی‌اکسیدانی) در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده از کاهش تراکم استخوانی ناشی از کمبود استروژن جلوگیری می‌کند. همچنین مشخص شده است که تجویز Risedronate باعث تضعیف فعالیت استئوکلاست‌ها می‌شود (۲۵). دانه کتان علاوه بر این که سرشار از ترکیبات فیتواستروژنی است، یک منبع غنی از انواع مختلف فنل‌ها مانند لیگنان، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و تانن‌ها می‌باشد که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قوی شناخته می‌شود (۱۱، ۱۲). از طرفی بیان شده است که ورزش روشی مطمئن و مؤثر برای جلوگیری از تخریب استخوان در زنان یائسه می‌باشد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که ورزش ملایم در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده از استئوپوروز جلوگیری می‌کند (۲۶). مشخص شده است که استروژن قادر است بیان ژن PTH را کاهش دهد (۲۷). نتایج تحقیق حاضر این موضوع را تأیید می‌کند چراکه در این تحقیق غلظت سرمی PTH در گروه اواریکتومی شده نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. مطالعه انجام‌گرفته توسط Lihui و همکاران مشخص نموده است که ورزش در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده باعث افزایش دانسیته استخوانی از طریق کاهش باز جذب استخوان و افزایش تشکیل آن می‌گردد (۲۶). کاهش غلظت سرمی هورمون PTH و استئوکلسین و همچنین افزایش غلظت سرمی کلسیم و ALP در گروه‌های تیمار نسبت به گروه اواریکتومی شده نشانگر بهبود وضعیت در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه اواریکتومی شده است.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب ورزش هوازی و عصاره کتان

شد که این نتایج نیز هم‌راستا با مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان استئوکلسین کاهش یافته متعاقب اواریکتومی پس از تیمار با عصاره کتان، به دلیل خاصیت فیتواستروژنیک آن، بهبود پیدا کردند (۲۴). بررسی داده‌های مربوط به غلظت سرمی آلکالین فسفاتاز (ALP) ((Alkaline Phosphatase)) نشان داد که در گروه اواریکتومی شده میزان این فاکتور به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته است؛ اما بین گروه اواریکتومی\_ورزش و گروه اواریکتومی\_عصاره اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین مشخص شد در گروه اواریکتومی\_ورزش\_عصاره در مقایسه با گروه‌های ورزش تنها و عصاره تنها غلظت سرمی ALP به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. به عبارتی م صرف عصاره کتان به همراه انجام ورزش هوازی منجر به بهبود این فاکتور در موش‌های مورد مطالعه نسبت به سایر گروه‌های تیمار شده است. مطالعه صورت گرفته توسط jianfeng و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داده است که غلظت سرمی آنزیم ALP در گروه اواریکتومی شده به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. ALP توسط استئوبلاست‌ها تولید شده و برای معدنی شدن استخوان ضروری است (۲۱)؛ که این نتیجه با مطالعه ما هم‌سو می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر Qi و Zheng بیان کردند که اواریکتومی باعث افزایش معنی‌داری در سطح سرمی ALP می‌شود که هم‌راستا با نتایج مطالعه ما بود. از طرفی بیان کردند که تیمار با فیتواستروژن‌ها منجر به بهبود فاکتور ALP خواهد شد که این نتایج نیز هم‌راستا با مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان ALP افزایش یافته متعاقب اواریکتومی پس از تیمار با عصاره کتان بهبود پیدا کرد (۲۴).

در مطالعه حاضر بررسی نتایج مربوط به غلظت سرمی Calcium مشخص نمود که در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده غلظت سرمی کلسیم نسبت به گروه کنترل طور معنی‌داری کاهش یافته است. نتایج مربوط به غلظت سرمی PTH مشخص نمود که در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده غلظت سرمی هورمون PTH نسبت به گروه کنترل طور معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین غلظت سرمی هورمون پاراتورمون در

on yield and yield components of linseed. *New Zealand J. Agric.* 2005;35:44-56.

11. Brzezinski A, Adlercreutz H, Shaoul R, Rosier A, Shmueli A, Tanos V, Schenker JG. Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. *Menopause.* 1997 Jan 1;4(2):89-94.

12. Kasote DM. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *Int Food Res J.* 2013;20:27-34.

13. Sallam N, Laher I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Long.* 2016 Oct;2016.

14. Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, Harbour RT, Caldwell LM, Creed G. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(7).

15. Hojjati S, Nazem F, Daryanoosh F, Vojdani S. The Effect of Moderate Intensity Running Exercise on Femoral Bone Microarchitectures in Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. *J Fasa Univ Med Sci.* 2015 Aug 10;5(2):278-87.

16. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *BioMed Res Int.* 2015 Apr 28;2015.

17. Cai DJ, Zhao Y, Glasier J, Cullen D, Barnes S, Turner CH, et al. Comparative effect of soy protein, soy isoflavones, and 17 $\beta$ -estradiol on bone metabolism in adult ovariectomized rats. *J Bone Min Res.* 2005 May;20(5):828-39.

18. Salehi I, Mohammadi M, Asadi Fakhri A. The effect of treadmill exercise on antioxidant status in the hearts of the diabetic rats. *Avicenna J Clin Med.* 2009 Sep 15;16(2):20-7. (Persian)

19. Al-Ani IM, Al-Ani GA, Azzubaidi MS, Al-Ahmed BI. The Effect of Flaxseed Ethanolic Extract on the Structure of the Kidney and the Endocrine Pancreas in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Makara J Health Res.* 2017;21(3):3.

20. Perretti G, Virgili C, Troilo A, Marconi O, Regnicoli GF, Fantozzi P. Supercritical antisolvent fractionation of lignans from the ethanol extract of flaxseed. *J Supercrit Fluids.* 2013 Mar 1;75:94-100.

21. Han J, Wang W. Effects of tanshinol on markers of bone turnover in ovariectomized rats and osteoblast cultures. *PLoS One.* 2017 Jul 26;12(7):e0181175.

22. Goulet GC, Halonen NR, Koch LG, Britton SL, Zernicke RF, Kozloff KM. Osteoblast response to ovariectomy is enhanced in intrinsically high aerobic-capacity rats. *Calcif Tissue Int.* 2011 Apr;88(4):325-35.

23. Xiaolei SU, Fengbo LI, Xinlong MA, Jianxiong MA, Bin ZH, Zhang Y, et al. The effects of combined treatment with naringin and treadmill exercise on osteoporosis in ovariectomized rats. *Sci Rep.* 2015

منجر به بهبود عوارض ناشی از اواریکتومی و نقصان استروژن در موش‌های مورد مطالعه شده است. هرچند برای تعمیم نتایج در انسان و یافتن ترکیب مؤثر موجود در عصاره نیاز به تحقیقات بیشتری است.

## تقدیر و تشکر

محققین از کار شنا سان محترم آزمایشگاه فیزیولوژی به‌ویژه آقای مهندس رسولی کوچی به پاس همراهی در انجام این تحقیق، قدردانی می‌نمایند.

## References

- Zhang Y, Yu L, Ao M, Jin W. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *J Ethnopharmacol.* 2006 Apr 21;105(1-2):274-9.
- Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O, Yildiz A, Sahin NO, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol.* 2007 Mar 1;26(3):380-4.
- Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, et al. Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int.* 2005 Jun;16(6):581-9.
- Walker-Bone K, Walter G, Cooper C. Recent developments in the epidemiology of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2002 Jul 1;14(4):411-5.
- Dennison E, Cole Z, Cooper C. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005 Jul 1;17(4):456-61.
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Compar Med.* 2008 Oct 15;58(5):424-30.
- Talmage DW, Talmage RV. Calcium homeostasis: how bone solubility relates to all aspects of bone physiology. *J Musculoskelet Neuron Interact.* 2007 Apr 1;7(2):108.
- Mohajeri D, Mesgar M, Rezaie A, Balila A. Histopathological study of osteoporotic changes after experimental creation of osteoporosis by ovariectomy in the rat. *J Vet Clin Pathol.* 2007;2(2):97-108. (Persian)
- Blum SC, Heaton SN, Bowman BM, Hegsted M, Miller SC. Dietary soy protein maintains some indices of bone mineral density and bone formation in aged ovariectomized rats. *J Nutr.* 2003 May 1;133(5):1244-9.
- Gabiana C, McKenzie BA, Hill GD. The influence of plant population, nitrogen and irrigation

Aug 11;5(1):1-9.

24. Qi S, Zheng H. Combined effects of phytoestrogen genistein and silicon on ovariectomy-induced bone loss in rat. *Biol Trace Element Res.* 2017 Jun 1;177(2):281-7.

25. Erben RG, Mosekilde L, Thomsen JS, Weber K, Stahr K, Leyshon A, et al. Prevention of Bone Loss in Ovariectomized Rats by Combined Treatment With Risedronate and  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D3. *J Bone Min Res.* 2002 Aug;17(8):1498-511.

26. Li L, Chen X, Lv S, Dong M, Zhang L, Tu J, et al. Influence of exercise on bone remodeling-related hormones and cytokines in ovariectomized rats: a model of postmenopausal osteoporosis. *PloS One.* 2014 Nov 13;9(11):e112845.

27. Khosla S, Atkinson EJ, Melton III LJ, Riggs BL. Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 May 1;82(5):1522-7.