The effect of effective dose phytoestrogen of esteoperosis induced in femal rabbits

تأثيرالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي المستخلص على هشاشة العظام المستحث في اناث الارانب

كعيم ،غصون غانم* البازي،وفاق جبوري**
*جامعة كربلاء، كلية التمريض ،فرع العلوم الطبية والاساسية **جامعة كربلاء ، كلية الطب البيطري

الخلاصة

قسمت عشوائيا 32 من اناث الارانب الى اربعة مجاميع (8 / مجموعة) تركت المجموعة الاولى مجموعة سيطرة (G1) وازيلت المبايض للمجموعة الثانية (G2)وحقنت المجموعة الثالثة ب0.2 mg/kg من الاستروجين النباتي بدون ازالة المبايض لها (G3)وعولجت المجموعة الرابعة بالجرعة المؤثرة بعد ازالة المبايض (G4).

وبعد قياس بعض المعايير الوظيفية لوحظت النتائج التالية:-في مجموعة الحيوانات مزالة المبايض ولمدة ستة اشهر لوحظ انخفاضا معنويا (P<0.05) في مستوى هرمون الاستروجين Estrogen(E) ومستوى الكلوتاثيون المختزل Glutathion(GSH) في مصل الدم بينما لوحظ زيادة معنوية (P<0.05) في مستوى MDA ومستوى تركيز الكالسيوم Ca ومستوى فعالية Alkaline Phosphate (ALP)بالمقارنة مع باقي المجاميع.بينما في مجموعة الحيوانات مزالة المبايض وعولجت بعد مرور ستة اشهر (G4) لوحظ زيادة معنوية (P<0.05) في مستوى الاستروجين E وGSH و انخفاضا معنويا (P<0.05) في مستوى MDA وCa وALP بالمقارنة مع مجموعة مزالة المبايض G2 .وفي مجموعة الحيوانات التي عوملت دون ازالة المبايض G3 فقد لوحظ لوحظ زيادة معنوية (P<0.05) في مستوى E وGSH ،وانخفاضا معنويا (P<0.05) في MDA وCa وALP ،بالمقارنة مع مجموعة الحيوانات مزالة المبايض G2 ومجموعة G4.وبالنسبة للدراسة النسيجية لوحظ تدهور في النسيج العظمي بزيادة الفراغات في متن النسيج العظمي وتطاول في قنوات فولكمان بمجموعة الاناث مزالة المبايض وعند حقن الجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي لوحظ قلة في تدهور النسيج العظمي .

نستنتج من الدراسة الحالية ان الجرعة المؤثرة الجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (phytoestrogen) المستخلص من حبوب الفاصولياء البيضاء الجافة له تأثير ايجابي على النسيج العظمي .

Abstract

This study was conducted to determine the impact of effective dose ED50 estrogenic plant (phytoestrogen)) extracted from the beans, white beans dry on the effectiveness female rabbits which induced Osteoporosis by bilateral removal of the ovaries. As for the experience of the second randomly divided 32 female rabbits (8 / group) left the first group control group (G1)) and removed the ovaries of the second group (G2) and injected into the third set to 0.2 mg / kg of plant estrogens without removing the ovaries have (G3) and treated Group IV with effective dose of (phytoestrogen) after the removal of the ovaries (G4). After some physiological parameters observed the following results- : In the group of animals removed ovaries and for a period of six months, observed a significant decrease (P <0.05) in the level of Estrogen (E) and the level of Glutathion (GSH) and phosphorus P in serum while observed a significant increase (P <0.05) at the level MDA and the level of calcium concentration and the level of effectiveness of Ca Alkaline Phosphate (ALP) in comparison with the rest of the groups.Group of animals removed ovaries and treated after six months (G4) observed a significant increase (P <0.05) in the level of estrogen E and GSH and p and a significant decrease (P <0.05) in MDA and Ca and ALP compared with the group removed the ovaries G2.Group of animals that were treated without removal of the ovaries G3 has been observed observed a significant increase (P <0.05) in the level of E and GSH and p, and a significant decrease (P <0.05) in the MDA and Ca and ALP, compared with a group of animals removed ovaries G2 and group G4.and For the study of histological observed deterioration in bone tissue with increase of the spaces in the body of bone tissue and affect the channels Volkmann group of female removed the ovaries . while when injection the effective dose of phytoestrogen observed lack of deterioration of bone tissue.

المقدمة Introduction

يعد مرض هشاشة العظام osteoporosis مرضا صامتا يصيب الانسان لسنوات متعددة من دون الكشف عنه ، وهو النقص في كتلة العظم bone mass الذي يؤدي الى سهولة كسره خاصة في منطقة الورك والعمود الفقري ،ينتشر مرض هشاشة العظام في العالم اذ يصاب حوالي 25 مليون شخص في الولايات المتحدة الامريكية (22) .

ان السبب الرئيس لمرض هشاشة العظام هو اختلال الموازنة بين وظيفة الخلايا البانية للعظم Osteoblasts والخلايا الهادمة للعظم Osteoclasts نتيجة لعوامل كثيرة منها سن الياس الطبيعي والجراحي والذي يؤدي الى انخفاض مستوى هرمون الأستروجين لما له من دورا مهما في ترسب المعادن في النسيج العظمي bone mineralization (62) ،(51) ومن الاسباب الاخرى هي تناول بعض الادوية لعلاج التهاب المفاصل والمضادة للحموضة والادوية المضادة للصرع ، وكذلك بسبب نقص فيتامين D وعنصر الكالسيوم في الطعام وقلة التعرض للاشعة فوق البنفسجية وكذلك الاصابة بمرض الفشل الكلوي المزمن وزيادة فعالية الغدة جنب الدرقية وتناول هرمونات قشرة الغدة الكظريةGlucocorticoidsوالادمان على الكحول والتدخين (44، 3) ، ان القشرانيات تؤثر على تكوين العظم من خلال تنشيط عملية الموت المبرمج apoptosis لخلايا بانية العظم او الخلل في عمل بعض العوامل المهمة لاعادة نمو العظم مثل ال osteoprogestins وال insulin like growth (49) وكذلك تنشط عملية الادمصاص Adsorption وتثبيط امتصاص الكالسيوم من الامعاء (1;10) . يعتبر Phytoestrogen من المركبات النباتية الطبيعية الذي يتميز بفعالية estrogenic and/or anti estrogenic ،و الذي يعتبر احد المركبات الفينوليه متغايرة الحلقات التي تحمل تركيب مشابه للستيرويد الأستروجيني steroid estrogenic بسبب احتواءه على مجموعة الهيدروكسيل والحلقة الفينولية . وهو من المقومات الأساسية لكثير من المواد الغذائية حيث يكثر وجود هذه المركبات في بعض المصادر الغذائية مثل (الفاصوليا، والكرنب الصغير والملفوف والسبانغ وفول الصويا وغيرها من الحبوب (63 ; 51).ان الاستروجينات النباتية مركبات مفيدة ومؤثرة في البالغين ولها دور في الحماية ضد بعض الامراض المعتمدة على الهرمونات والتي تتضمن سرطان الثدي،البروستات،القولون،المعدة والرئة وكذلك اعراض ما بعد سن اليأس وهشاشة العظام (67, 56).

ونظرا لاهمية هشاشة العظام ولزيادة نسب الاصابة به لاسباب متعددة من اهمها سن الياس ولكثرة تعاطي العلاجات الهرمونية وما لهذه العلاجات تاثيرات جانبية خطرة على الصحة جاءت اهداف الدراسة الحالية :- استخلاص الاستروجين النباتي Phytoestrogen من نبات الفاصولياء الجافة تم استحداث حالة هشاشة العظام Osteoporosis بازالة المبايض الثنائي Bilateral oophorectomy في اناث الارانب (5) ودراسة تأثير الجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي على بعض المعايير الفسلجية والنسيجية للنسيج العظمي.

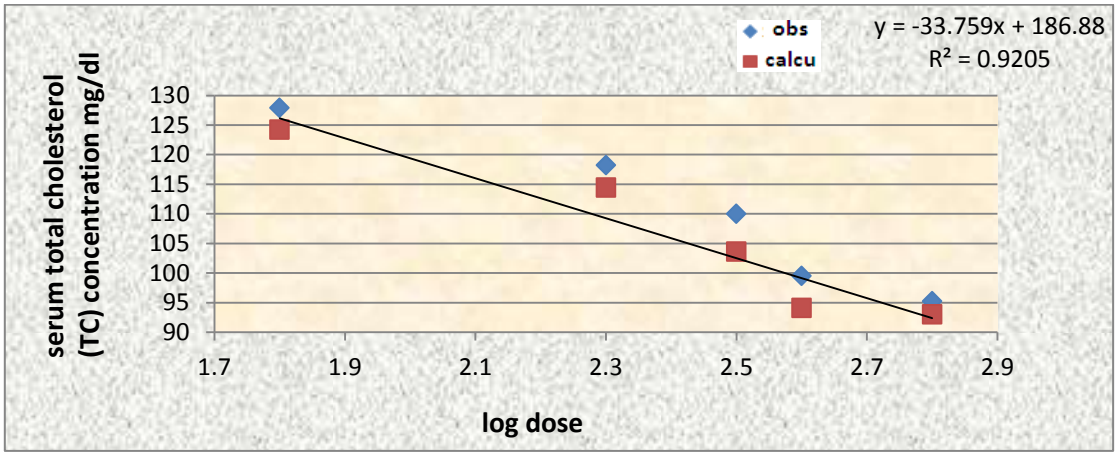
المواد وطرق العمل

بعد استخلاص الاستروجين النباتي phytoestrogen من الفاصوليا البيضاء المجففة المتوفرة بالأسواق حيث تم الاستخلاص حسب الطريقة المتبعة من قبل (53) .وحددت الجرعة المؤثرة وكانت 0.2 mg/kg . تم قياس الجرعة المؤثرة ED50 من خلال دراسة منحنى الاستجابة للجرع المختلفة Dose response curve، وقد استخدمت 5 جرع تصاعدية مختلفة من المستخلص واعطيت لاناث الارانب بالحقن العضلي يوميا ولمدة اربعة اسابيع ،لتحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص وقد استخدمت بعض المعايير الوظيفية لتحديد الجرعة المؤثرة لمستخلص نبات الفاصوليا مثل الكولسترول الكلي Total Cholesterol(TC) ، الشحوم البروتينية عالية الكثافة High lipoprotein density(HDL) ، وذلك من خلال الحقن العضلي اليومي للمستخلص ولمدة 4 أسابيع وقد بينت النتائج ان هناك تأثير معنوي للمستخلص على الصفات المذكورة وبمستويات معنوية مختلفة عند مستوى $p<0.05$. ثم اخذت 32 من اناث الارانب المحلية وقسمت عشوائياً وبصورة متساوية على أربع مجاميع (ثمانية لكل مجموعة) طيلة مدة التجربة(1-6) شهر، المجموعة الاولى مجموعة السيطرة G1 التي لم تتلقى اي معالجة او عملية ازالة المبايض ، المجموعة الثانية G2 اجريت لها عملية إزالة المبايض الثنائية فقط Bilateral oophorectomy دون اعطاء اي علاج ، لقد تمت العملية تحت ظروف جراحية معقمة إذ تم تخدير الحيوانات باستخدام مزيج من الكيتامين –زيلازين (40 ملغم /كغم +5 ملغم /كغم من وزن الجسم) .وضع الحيوان في وضع الاستلقاء الظهري .جرى تحضير بطن الحيوان للعملية الجراحية ،عمل شق جراحي في الجلد بطول 4 سم يمتد من السرة باتجاه الخلف ،ثم يزاد الشق ليشمل الغلالة البيضاء والبريتون بعد دفع الأعور جانبا ليبدو الرحم وبعد متابعة الرحم إلى الأعلى من جهة اليسار يمكن الوصول إلى المبيض الأيسر .يوضع ربطتان حول الشرايين المبيضية أعلى المبيض في مساريق المبيض وربطتان أخرى أسفل المبيض في الرباط الحقيقي باستخدام خيط قصابة Catgut حجم 0/4 ثم يقطع بين رباطين ثم قطع الرباط المعلق للمبيض لتحرير المبيض .بعدها يتم فحص الجدعة المتبقية للأوعية الدموية للتأكد من عدم وجود النزف ،ثم يتم ربط الخيوط مع بعضها وتعاد العملية على المبيض الأيمن ،ثم يتم غلق جدار البطن بالخياطة المستمرة بخيط القصابة 0/4 وغلق الجلد بالغرز المتقطعة بخيوط الحرير 0/4 .جرى إزالة الخيط بعد مرور 10 أيام **(9)** ،المجموعة الثالثة G3 مزالة المبايض والتي عوملت بأعطاء الجرعة المستخرجة من التجربة الاولى من الاستروجين النباتي phytoestrogen وبتركيز(0.2 mg/kg).اما المجموعة الرابعة G4 وعوملت فقط بالحقن العضلي للمستخلص. وتم قياس تركيز هرمون الاستروجين في مصل الدم لاناث الارانب وقياس معدل الكلوتاثيون GSH ومعدل تركيز المالونداليهايد MDA وقياس مستوى الكالسيوم Ca ومستوى الفسفور P ومعدل Alkaline phosphatase (ALP)، وكذلك اجريت التحضيرات النسيجية بحفظ العينة لمقطع نسيج العظم في البداية بعد استئصاله من الحيوان في محلول الفورمالين بتركيز10 % وبعد 5-4 ايام استخرجت من الفورمالين وغسلت عدة مرات بالكحول الاثيلي بتركيز 70% بعدها اجريت عليها سلسلة من العمليات اعتماداً على الطريقة الموصوفة في (50). ثم تم تصوير المقاطع النسيجية للعظم باستخدام كاميرا رقمية Digital Camera عالية الدقة . وتم

استخدم اختبار student t-test للاستدلال على الدلالة المعنوية، كما استعمل المعامل المعنوي الأصغر(LSD) Least Significance Difference في المقارنة بين النتائج فضلا عن الطرائق العيارية المستخدمة في تحديد المتوسط Mean والخطأ القياسي عند مستوى دلالة $p<0.05$.

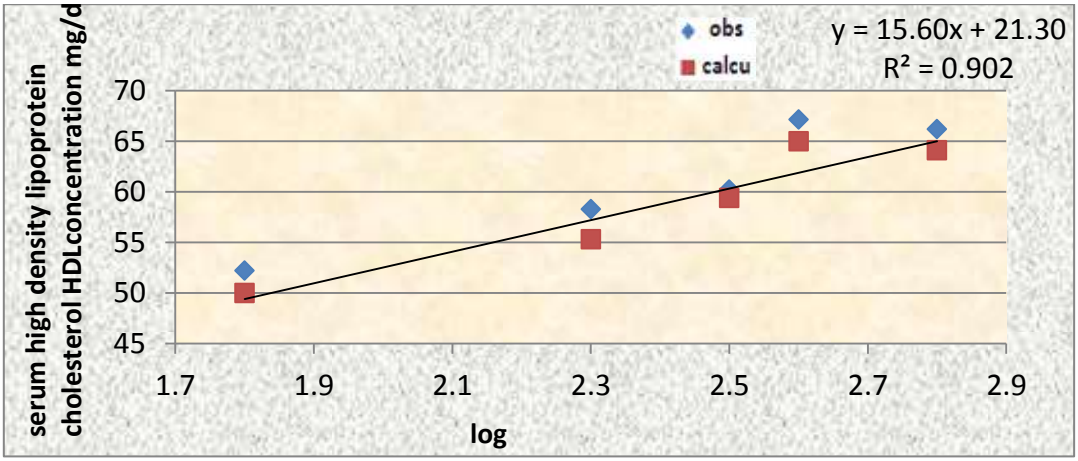
النتائج والمناقشة Result and Discussion

لقد بينت نتائج التجربة الثانية ان تاثير الاستروجين النباتي على الكولسترول كان معنويا في الاسبوع الثالث مقارنة مع الاسابيع الاخرى .لذلك تم اختيار هذه الفترة لدراسة نوع العلاقة بين تركيز الكولسترول في دم الارانب وجرعات الاستروجين .يلاحظ من الشكل(1) وجود علاقة خطية سالبة بين تركيز الاستروجين ومستوى الكولسترول.



شكل (1) تأثير الجرع المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الكوليستيرول الكلي (TC) بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أناث الارانب البالغة.n=8 لكل مجموعة، ED_{50} = 0.2mg/kg .

ومن الشكل (2) يلاحظ وجود زيادة معنوية فيHDL في مصل دم اناث الارانب للجرع المختلفة.وقد لوحظ ان ED50 للمستخلص المستخدم في الدراسة الحالية على تركيز HDL بلغت 0.2 mg/kg .



شكل (2) تأثير الجرع المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أناث الارانب البالغة. n=8 لكل مجموعة ED50=0.2 mg/kg .

ومن خلال الشكلين (1) و(2) تم حساب الجرعة للمستخلص والتي بلغت 0.2 ملغم/ كغم والتي اعتمدت للتجربة الثالثة للدراسة الحالية.

يشير الجدول (1)ان تأثير الجرعة المؤثرة والتي بلغت 0.2 mg/kg على تركيز الاستروجين في مصل دم الارانب للمجاميع G1, G2, G3 , G4 . اذ لوحظ وجود زيادة معنوية ($P< 0.05$) في مستوى تركيز الاستروجين للمجموعة G3 (مجموعة الحيوانات المعالجة بالحقن العضلي بالاستروجين المستخلص دون ازالة المبايض)بالمقارنة مع مجموعة G2 وG4 ومجموعة السيطرة G1 . بينما يشير الجدول الى انخفاضا معنويا ($P< 0.05$) في مجموعة الارانب مزالة المبايض بالمقارنة مع المجاميع الاخرى.

جدول (1) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز هرمون الاستروجين (µg/ml) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

المجاميع / الفترة الزمنية	G1	G2	G3	G4
قبل المعالجة	A 34.15 ±1.02	A 33.29 ±2.00	A 33.61 ±1.93	A 34.03 ±2.12
بعد 6 شهور	A a 33.17 ±1.05	B b 18.25 ±1.18	B c 46.91 ±2.05	B d 22.08 ±3.09

القيم تدل على المعدل ± الخطأ القياسي (n=8) لكل مجموعة،الحروف المختلفة الكبيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى $p<0.05$ ،الحروف المختلفة الصغيرة افقيا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى $p<0.05$. G1 تمثل مجموعة السيطرة Control،G2 تمثل مجموعة المزالة المبايض (Ovariectomized(OVX، G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض، G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen

أشارت الدراسة الحالية ان أستخدام الجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي المستخلص من نبات الفاصوليا والتي بلغت 0.2 mg/kg لها تأثيرا معنويا على مستوى الاستروجين في مصل دم الارانب مزالة المبايض .وبينت نتائج الدراسة الحالية في الجدول (1) وجود انخفاض معنوي في مجموعة G2 وهي الارانب مزالة المبايض Ovariectomized حيث يعزى السبب في انخفاض هرمون الاستروجين الى ازالة المبايض مما ينتج تراجع وتدهور في صناعته وإنتاجه لفقدان المبايض وهي المركز الرئيس لإنتاج هرمون الاستروجين وتتفق هذه االنتائج مع (18) وكذلك مع (62) و (26) .

وينخفض هرمون الاستروجين كحالة طبيعية لازالة المبايض وكذلك ينخفض في سن الياس لدى النساء وكذلك النساء المعرضات لازالة المبايض جراحيا وبالتالي ينخفض الاستروجين ويرتفع مستوى هرموني LH و FSH عن طريق التغذية الاسترجاعية Feed back بين هرمونات الغده النخامية والمبيض لانتاج الهرمونات السيترويدية (19). وفي حالة ازالة المبايض جراحيا عند النساء وهي المصدر الرئيسي للاستروجين يتراجع الهرمون لتظهر اعراض سن اليأس(.15 ,30) .

كما اشارت الدراسات (38 ;6) بان الخلل الوظيفي للمبايض لدى النساء المصابات بتكيس المبايض او امراض اخرى تؤدي الى انخفاض معنوي في مستوى هرمون الاستروجين نتيجة لعدم التوازن في هرمونات المناسل. وتشير النتائج لارتفاع مستوى الاستروجين ويتحسن معدله في مصل الدم لمجموعة الارانب مزالة المبايض والمعالجة بالجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي.وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (25) والذي استخدم مستخلص عشبة مائية على اناث الجرذان مزالة المبايض و (26) والذي استخدم بدراسته بروتينات فول الصويا المجرعة لاناث الارانب مزالة المبايض حيث ارتفع مستوى الهرمون بعد العلاج .

يلاحظ من الجدول (2) وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في معدل GSH في مجموعة الارانب مزالة المبايض G2 بعد 6 شهور من العملية مقارنة بمجموعة السيطرة G1 .كما يشير الجدول ان مجموعة الحيوانات التي حقنت عضليا بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) تؤثر وبشكل ايجابي لارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في مجموعة G3 عند مقارنتها بمجموعة G2 المجموعة المزالة المبايض وكذلك مجموعة السيطرة G1 ولم يلاحظ فروقا معنوية في مجموعة G4 المجموعة المعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) مزالة المبايض طول مدة التجربة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة G1.

جدول (2) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل الكلوتاثيون GSH(Mmol/L) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

المجاميع / الفترة الزمنية	G1	G2	G3	G4
قبل المعالجة	A 7.54 ±0.91	A 7.36 ±0.68	A 7.16 ±0.73	A 7.18 ±0.91
بعد 6 شهور	A a 7.28 ±0.93	B b 3.05 ±0.78	B c 12.29 ±0.69	A a 6.90 ±0.83

القيم تدل على المعدل ± الخطأ القياسي (n=8) لكل مجموعة،الحروف المختلفة الكبيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى $p<0.05$ ،الحروف المختلفة الصغيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى $p<0.05$ .G1 تمثل مجموعة السيطرة Control،G2 تمثل مجموعة المزالة المبايض (Ovariectomized (OVX، G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض، G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen

توضح النتائج للجدول (3) حدوث ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في مستوى المالونداليدهايد (MDA) في مجموعة الحيوانات المزالة المبايضG2 مقارنة بمجموعة G3 و G4 ومجموعة السيطرة G1. وكما تشير النتائج الى وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في المجموعة المعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) G3 عند مقارنتها بمجموعة G2 مجموعة الارانب المزالة المبايض وكذلك بمقارنتها بمجموعة السيطرة G1 لما للاستروجين النباتي من تأثير ايجابي على مستوى MDA . ويلاحظ من الجدول(3) وجود انخفاض معنوي في المجموعة G4 المجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) عند مقارنتها بمجموعة G2 المجموعة المزالة المبايض.

جدول (3) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز المالونداليهايدMDA Mmol/dL) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

المجاميع / الفترة الزمنية	G1	G2	G3	G4
قبل المعالجة	A 0.46 ±0.012	A 0.47 ±0.011	A 0.41 ±0.013	A 0.42 ±0.020
بعد 6 شهور	A a 0.48 ±0.013	B 2.16 ±0.025	 0.25 ±0.028	 1.03 ±0.035

القيم تدل على المعدل ± الخطأ القياسي (n=8) لكل مجموعة،الحروف المختلفة الكبيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى $p<0.05$ ،الحروف المختلفة الصغيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى $p<0.05$ .G1 تمثل مجموعة السيطرة Control،G2 تمثل مجموعة المزالة المبايض (Ovariectomized(OVX، G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض، G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen.

اشارت الدراسة الحالية ان عملية أزالة المبايض تؤدي الى انخفاض معنوي في مستوى تركيز هرمون الاستروجين والتي اتفقت مع (64) وبالتالي زيادة في حالة الاجهاد التأكسدي Oxidative stress (وهي حالة عدم التوازن بين المؤكسدات Pro-Oxidant ومضادات التاكسد Antioxidant) نتيجة لزيادة المؤكسدات وانخفاض مستوى مضادات الاكسدة مثل هرمون الاستروجين والذي يعتبر هرمون مضاد للاكسدة داخل الجسم .

وقد لوحظ في الدراسة الحالية انخفاضا معنويا في مستوى GSH وارتفاعا معنويا في مستوى MDA في مجموعة الارانب مزالة المبايض (57;27).

والنتائج متفقة مع (7;66) حول ارتفاع MDA وانخفاض معنوي لمستوى GSH الذي يعتبر احد انزيمات المؤكسدات في مصل الارانب مزالة المبايض وان النقص في هرمونات المبايض له علاقة مع الفشل بعدم توازن حالة الاجهاد التاكسدي oxidative Strees اي عدم التوازن بين المؤكسدات ومضادات التأكسد .

وفي دراسات اخرى أوجد كل من .(42) (31) ان مضادات الاكسدة وبضمنها مستويات GSH منخفض في المرضى المصابين بهشاشة العظام Osteoprosis واوجدوا انه ميكانيكيات مضادات الاكسدة وبضمنها مستويات GSH تكون منخفضة في

الحيوانات مزالة المبايض وكذلك تتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسة الحالية بانخفاض GSH في الحيوانات المزالة المبايض.ان الانزيمات المضادة للاكسدة Antioxidant Enzymes هي النظام الدفاعي ضد الجذور الحرة Free radical والجذور تتوسط تحطم الانسجة و الخلايا وان عمل المؤكسدات القضاء على الجذور الحرة او تثبيط فعالية الاوكسجين الداخلي المتوسط للمنتجات الغير جذرية ان هذه الانزيمات تحتوي على الكلوتاثايون Glutathione (15).ويعتبر الاستروجين النباتي لمحتواه الفينولي والفلافونديات Flavonoids ذو فعالية علاجية جيدة فهو يعالج للكثير من الالتهابات مثل كونه مضاد للالتهاب ومضاد للاكسدة وكذلك لفعاليته المضادة للسرطان (33)، (20)،(47).

ان انخفاض مستوى هرمون الاستروجين في مجموعة مزالة المبايض يزيد من توليد الجذور الحرة الاوكسجينية وانواع الاوكسجين الفعالة(Reactive Oxygen Species (ROS وبالتالي احداث تأكسد الدهون Lipid Peroxidation والذي يكون البيروكسيدات الداخلية الحلقية وأيضا يعمل على تكسير سلسلة الاسيل في الدهون الفسفورية الموجودة في غشاء الخلية مؤديا الى تغيرات في ديناميكية الغشاء وتحطيمه فتقل مضادات الاكسدة ومنها GSH وبالتالي ارتفاع MDA الذي يعتبر كمؤشر للمؤكسدات التي تحطم اغشية الخلايا (68)،(45)،(51) .

ويشير الجدول (4) الى وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى ايون الكالسيوم للمجموعة G2 مزالة المبايض والغير معالجة بالأستروجين النباتي مقارنة بمجموعة السيطرة G1 .كما يلاحظ وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) لمستوى ايونات الكالسيوم في المجموعة المعالجة بالجرعة المؤثرة للأستروجين النباتي (Phytoestrogen) G3 مقارنة بمجموعة G2 و G1 .كما لوحظ وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) لمستوى ايونات الكالسيوم للمجموعة المعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للأستروجين النباتي (Phytoestrogen) بعد أزالة المبايض G4 مقارنة بمجموعة G2 .

جدول (4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في مستوى الكالسيوم Calcium (mg/ dl) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

المجاميع / الفترة الزمنية	G1	G2	G3	G4
قبل المعالجة	A 8.61 ±1.31	A 9.20 ±1.43	A 8.68 ±1.15	A 9.91 ±1.71
بعد 6 شهور	a B 8.26 ±2.00	b B 60.73 ±1.30	c B 5.07 ±1.40	d B 26.75 ±1.82

القيم تدل على المعدل ± الخطأ القياسي (n=8) لكل مجموعة،الحروف المختلفة الكبيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى $p<0.05$ ،الحروف المختلفة الصغيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى $p<0.05$. G1 تمثل مجموعة السيطرة Control،G2 تمثل مجموعة المزالة المبايض (Ovariectomized(OVX، G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض، G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen.

ان الارتفاع المعنوي في مستوى ايونات الكالسيوم في مصل دم اناث الارانب مزالة المبايض للدراسة الحالية جاءت متفقة مع (11) ,(8) و (35) بالاضافة الى الزيادة لنشاط خلايا ناقضة العظم Osteoclast وزيادة عدد الناضجة منها Mature Osteoclast و زيادة تحرير الكالسيوم والفوسفات Phosphate وكذلك البيبتيدات Peptides مع المادة الاساس للعظم Matrix.

ان حصول حالة الاجهاد التأكسدي والناتجة من الزيادة في الجذور الحرة مثل (ROS) وانخفاض في مستوى مضادات الاكسدة مثل انخفاض في مستوى الاستروجين تزيد في اكسدة الدهون Lipid peroxidation والذي كشف من خلال تشخيص الزيادة في نشاط خلايا ناقضة العظم (13).ان التدهور في متانة العظم ناتج من الزيادة في اعداد الخلايا الناقضة للعظم والتي تؤدي الى الزيادة في ادمصاص مادة العظم ووجود علاقة وثيقة بين نقص هرمون الاستروجين وزيادة نشاط الخلايا الناقضة للعظم (54) وان هشاشة العظام هو من اكثر امراض العظام الايضية انتشارا والناتج من النقص الحاصل في هرمونات المبايض واهمها هرمون الاستروجين حيث يختفي هرمون الاستروجين في سن اليأس Menopause او ازالة المبايض جراحيا مما يسبب فقدان في كتلة العظم.كما لوحظ اكسدة الدهون وانخفاض في كتلة العظم وان زيادة الاجهاد التأكسدي يكون عامل خطورة للاصابة بمرض هشاشة العظام) Osteoprosis(7) .اشار الباحث (28) ان السايتوكينات (IL-1)،(TNF-α) ،من المحفزات القوية لادمصاص العظم داخل وخارج الجسم .وقد وجد ان هذه السايتوكينات تزداد مع زيادة IL-6 والمتزامنة مع الزيادة في اعداد خلايا وحيدة النواة في الدم المحيطي الدائر لدى النساء في سن اليأس الطبيعية والجراحية.

وتشير نتائج الجدول (5) الى وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل الفسفور في مجموعة G2 وهي مجموعة مزالة المبايض بمقارنتها بمجموعة G2 وG4 ومجموعة السيطرة G1 .وكذلك يوضح الجدول وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل P للمجموعة G3 المجموعة المعالجة بمقارنتها بمجموعة السيطرة G1 وهذا يوضح الدور الايجابي للحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) . وتدل النتائج الى وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل P بالمجموعة G4 المعرضة لازالة المبايض والمعالجة بالحقن العضلي للجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي

(Phytoestrogen) عند مقارنتها بمجموعة G2 المزالة المبايض والغير معالجة ومجموعة السيطرة G1.كما وتشير النتائج الى عدم وجود اي فروق معنوية في معدل الفسفور بين المجاميع G4,G3,G2 قبل المعالجة طول مدة التجربة مقارنة بمجموعة السيطرة G1

جدول (5) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في مستوى الفسفور phosphorus (mg/dl)لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

المجاميع / الفترة الزمنية	G1	G2	G3	G4
قبل المعالجة	A 6.30	A 6.08	A 6.23	A 6.41
بعد 6 شهور	a B 6.24	b B 1.05	c B 7.98	d B 4.93

القيم تدل على المعدل ± الخطأ القياسي (n=8) لكل مجموعة،الحروف المختلفة الكبيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى p<0.05 ،الحروف المختلفة الصغيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى p<0.05 .
G1 تمثل مجموعة السيطرة Control،G2 تمثل مجموعة المزالة المبايض Ovariectomized(OVX)، G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض، G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen

تشير النتائج لانخفاض معدل الفسفور في المجموعة مزالة المبايض لارتفاع معدل الكالسيوم في هذه المجموعة حيث يكون التناسب عكسي بين الكالسيوم والفسفور بمصل الدم (65)وكذلك لوحظ ايضا ان نقص الاستروجين من فقدان المبايض وانخفاض مستواه في مصل الدم يكون مرتبط مع النقصان الحاصل في كتلة العظم للجرذان مزالة المبايض وكذلك ارتباطه مع سن الياس وحدوث مرض هشاشة العظام Osteoporosis حيث ينتج عنه اختلال التوازن بين عدد الخلايا بانية العظم Osteoblast وخلايا ناقضة العظم Ostoclast (55) .كذلك للاستروجين النباتي تاثير وقائي وحماية ضد فقدان العظم المتسبب بسبب نقصان الاستروجين لدى الحيوانات مزالة المبايض وهو يتوسط التعبير الجيني المتعلق بأيض العظم (40).

تتفق نتائج الدراسة حول انخفاض معدل الفسفور في مجموعة الارانب مزالة المبايض مع (11) , (29) و(35)حيث قد يكون السبب للتحفيز القوي لهرمونات جار الدرقية ولارتفاع الكالسيوم الذي يزيد من ادمصاص العظم في الحيوانات مزالة المبايض حيث يزداد معدل الكالسيوم بمصل الدم ويقل معدل الفسفور ويزداد ادمصاص العظم وبالتالي التعرض للاصابة بمرض هشاشة العظام Osteoprosis .

وتشير نتائج الجدول (6) الى وجود ارتفاع معنوي (P<0.05) في معدل ALP في مجموعة G2 وهي مجموعة مزالة المبايض بمقارنتها بمجموعة G1 مجموعة السيطرة .وكذلك يوضح الجدول وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في معدل ALP للمجموعة G3 المجموعة المعالجة بمقارنتها بمجموعة السيطرة G1 وهذا يوضح الدور الايجابي للحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) . وتدل النتائج الى وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في معدل ALP بالمجموعة G4 المعرضة لازالة المبايض والمعالجة بالحقن العضلي للجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) عند مقارنتها بمجموعة G2 المزالة المبايض والغير معالجة .

جدول (6) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل (Alkaline phosphates ALP)(U/L)لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

المجاميع / الفترة الزمنية	G1	G2	G3	G4
قبل المعالجة	A 9.23	A 8.64	A 9.04	A 8.85
بعد 6 شهور	a B 9.17	b B 26.63	c B 5.77	d B 15.29

القيم تدل على المعدل ± الخطأ القياسي (n=8) لكل مجموعة،الحروف المختلفة الكبيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى p<0.05 ،الحروف المختلفة الصغيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى p<0.05 .
G1 تمثل مجموعة السيطرة Control،G2 تمثل مجموعة المزالة المبايض Ovariectomized(OVX)، G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض، G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen

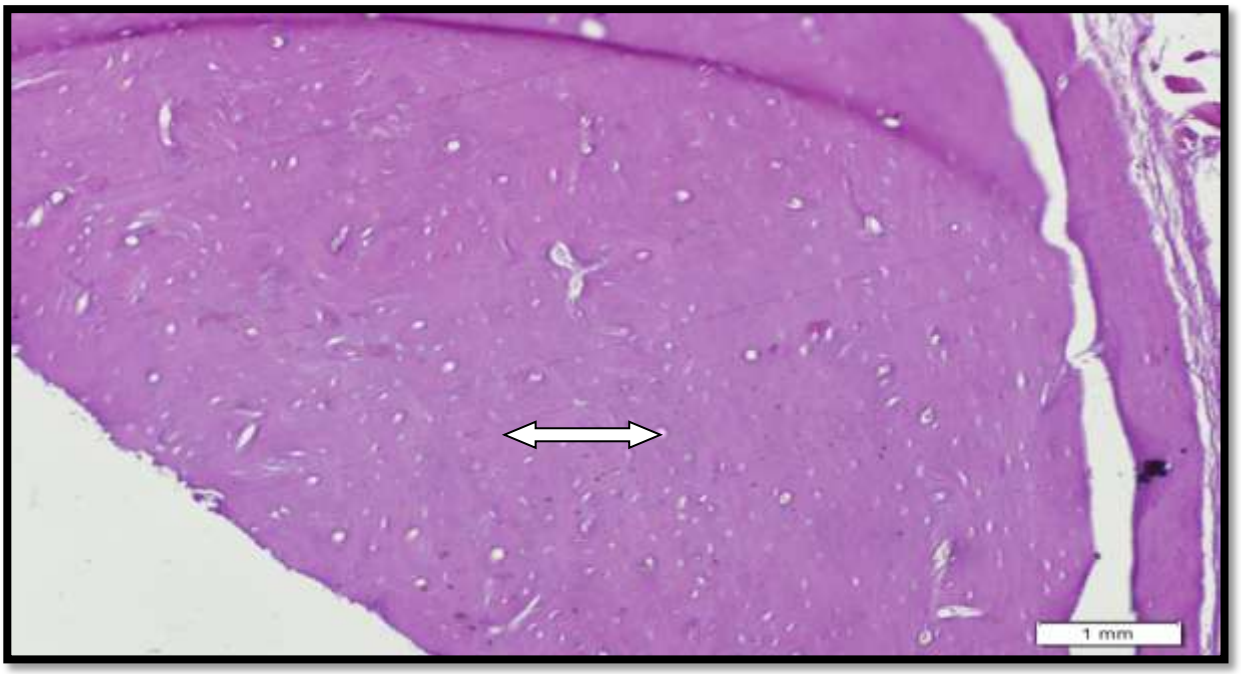
يلاحظ من خلال نتائج الدراسة الحالية ارتفاع معنوي في معدل ALP في الحيوانات مزالة المبايضG2 يكون متفق مع دراسة (60)و(16) ويلاحظ انه بارتفاع ALP يرتفع تحويل العظم bone turnover .

وأيضا زيادة مستوى ALP تتفق مع دراسة (3) حيث لوحظ بهذه الدراسة الارتفاع الحاصل في مستوى ALP بعد عملية ازالة المبايض مما يزيد في مستوى osteocalcin و له علاقة مع التغيرات المعنوية في مستوى Osteocalcin المرتبط مع الخلايا Osteoclast في الجرذان مزالة المبايض .كذلك لاحظ (61) ارتفاع انزيم Alkaline Phosphatese (ALP) وهو احد المؤشرات الكيميائية لمكونات العظم في الحيوانات وهي مجموعة الاغنام مزالة المبايض وهذا متفق مع الدراسة الحالية حول ارتفاع هذا الانزيم في المجموعة المزالة المبايض وهذا يؤدي الى (Bone Turnover) تحويل العظم وزيادته تكون مشابهه للحالات التي تحصل في النساء في سن مابعد الياس Post menopausal .

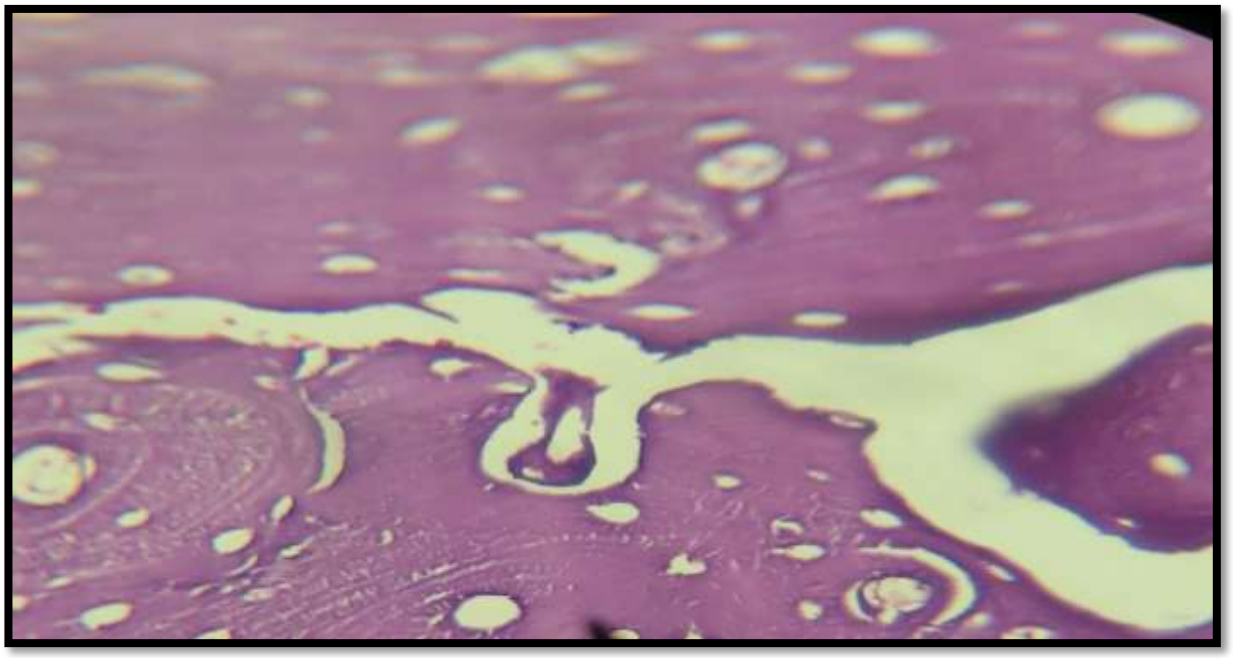
وكذلك ترتفع الفعالية في النساء بين سن الياس وفي حالة ازالة المبايض نتيجة لنقص هرمون الاستروجين ايضا يزداد تحول العظام فترتفع فعالية انزيم ALP وايضا تزداد بامراض العظام (مثل الكساح العظم وامراض سرطان العظم وهشاشة العظام) بسبب تنخر العظم مما يؤدي الى زيادة بتسرب الانزيم الى مصل الدم. او قد يعزى السبب لارتفاع مستوى فعالية انزيم ALP الى كون الانزيم له دور في عملية نقل الفوسفات والكالسيوم والصوديوم والبوتاسيوم بالاضافة الى دوره المهم في العمليات الايضية Metabolic Process فان مستواه يرتفع في حالة الاصابة بامراض الجهاز البولي نتيجة الاضطراب الحاصل في تركيز هذه المعادن وايوناتها خلال الاصابة بالمرض(48، 23).ويكون التاثير ايجابي للاستروجين النباتي على مستوى انزيم ALP وتتفق النتائج الحالية مع (17) حيث يلاحظ ان المعالجة بالاستروجين النباتي phytoestrogen له دور في انخفاض مستوى فعالية انزيم ALP في مصل دم اناث الارانب التي حقنت عضليا بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي .

اشارت الدراسة الحالية الى حصول تدهور بالنسيج العظمي حيوانات مزالة المبايض كما في الصورة رقم(1) وقد اتفقت النتيجة مع (32) ،(5) ،(14) و(24) ان انخفاض مستوى الاستروجين نتيجة لازالة المبيض يعزز ويزيد من فعالية خلايا ناقضة العظم وبالتالي يزيد الادمصاص (Adsorption) العظم حيث يصبح العظم ضعيف جدا ويقل ترسب المعادن فيه ،انخفاض مستوى الاستروجين يحفز انتاج البروتينات الضارة للنسيج العظمي مثل (Osteogenin,bone morphogenic proteins) وكذلك التغيرات التي تعود للاختلافات الحاصلة بعوامل النمو مثل (transforming growth factor and insulin-like growth factor) وبذلك تحصل حالة تشوه العظم (36) ، (32) ،(21) و(46) ، كما ان تولد الجذور الحرة بتقدم العمر تؤدي الى فقدان كتلة العظم بالاضافة الى تموت الخلايا العظمية osteocyte (43)و(39)، (12).كما ان انخفاض مستوى تركيز هرمون الاستروجين يؤدي الى اختزال في نسبة المعادن المترسبة في المادة الاساس نتيجة للتغير في ايض ووظيفة خلايا النسيج العظمي osteocyte وحصول تغيرات في الروابط المحيطة بالخلايا العظمية وكبر في حجم الفجوات lacunae في الحيوانات مزالة المبايض . (38) و(2) مقارنة بمجموعة السيطرة صورة (1).

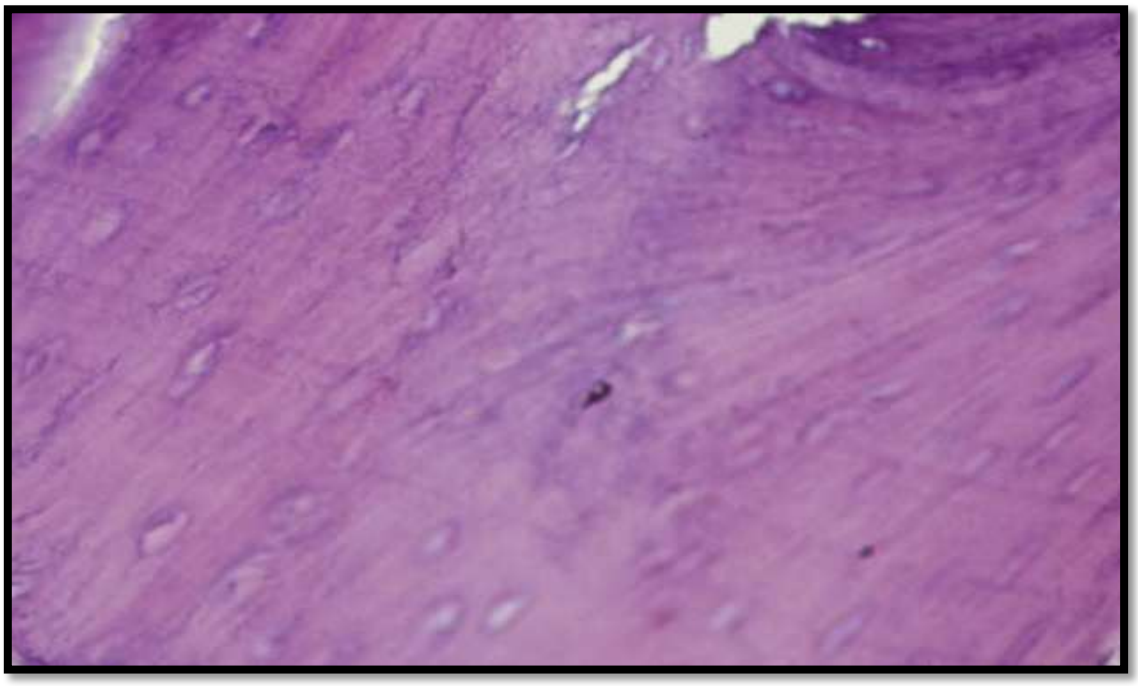
اما مجموعة الحيوانات التي تم حقنها عضليا بED50 بالاستروجين النباتي المستخلص من الفاصوليا اليابسة بعد ازالة المبايض لوحظ قلة تدهور النسيج العظمي زيادة في تماسك المادة الاساس وصغر في حجم الفجوات lacunae وتراجع بالتغيرات المرضية للنسيج العظمي صورة (4) بمقارنتها بمجموعة مزالة المبايض صورة (2) .ويلاحظ بمقطع النسيج العظمي مجموعة الارانب المعالجة بدون ازالة المبايض قلة في طول قنوات فولكمان وزيادة في كثافة العظم وصغر حجم الفجوات صورة (3) .اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (3) ، (12 و(32) حيث لاحظوا ان العلاج بالاستروجين النباتي لنبات الفاصوليا البيضاء اليابسة ذو فعالية جيدة على نسيج العظمي فيكون المقطع خالي من التجاويف الموجودة بالمجموعة مزالة المبايض وكذلك صغر بحجم lacunae وعودة الترتيب الهندسي للنسيج العظمي وتراجع في ادمصاص العظم bone resorption ويزداد تكون العظم bone formation وازدياد عدد الخلايا والتجهيز الدموي .كذلك اجرى (52)دراسته على الجرذان مزالة المبايض والمعالجة بالاستروجين انه يساعد على تعزيز خلايا العظم وتراجع التدهور الذي يحصل عند ازالة المبايض ويقل فقدان العظم وتزداد كتلة العظم من المعادن وان الاستروجين النباتي له فعل مضاد للاكسدة حيث يحافظ على العظم من مهاجمة الجذور الحرة .



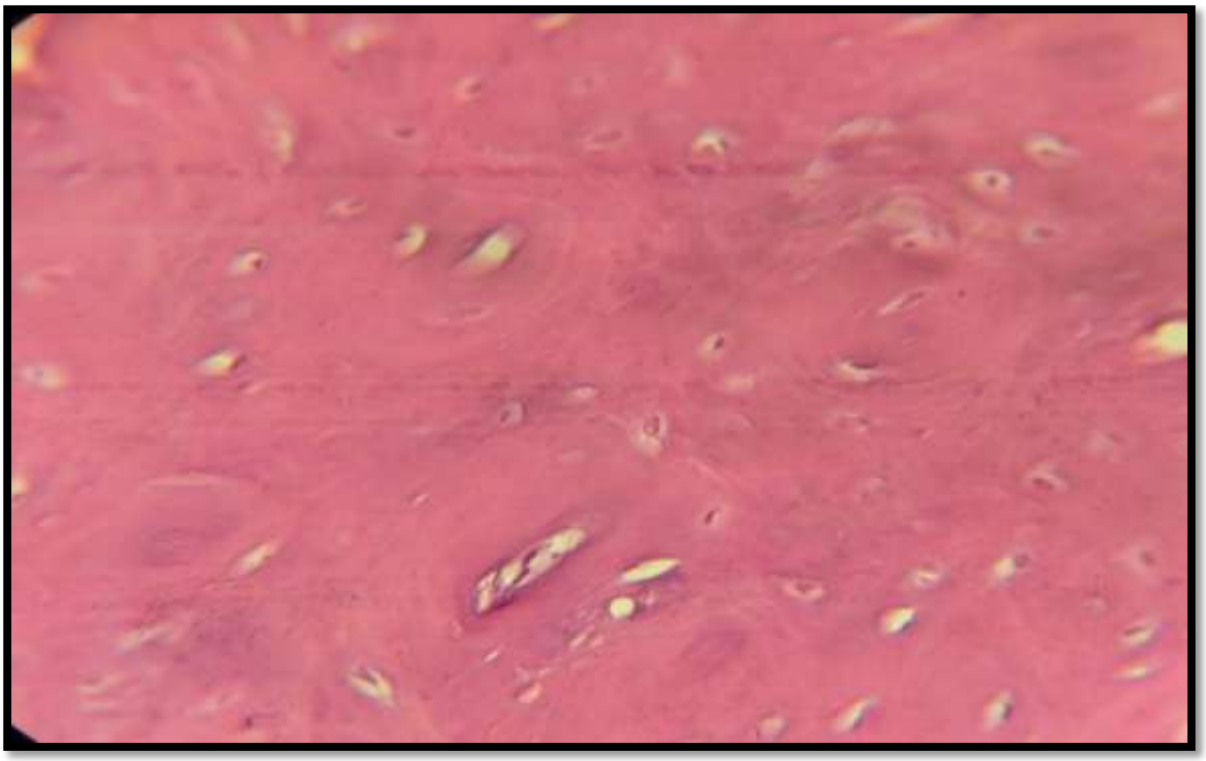
صورة(1)مقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة حيوانات السيطرة يلاحظ فيها التركيب الطبيعي للنسيج



صورة (2)مقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة الحيوانات مزالة المبايض (OVX)يلاحظ فيه الفراغات ⟺ بين متن العظم وكذلك كبر حجم الفجوات lacunae ووجود الفراغات بالنسيج العظمي



صورة (3) مقطع نسيجي لعظم الفخذ لحيوانات المعالجة يلاحظ فيها تماسك المادة الاساس وقنوات هافرس ويلاحظ زيادة سمك النسيج العظمي .



صورة (4) مقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة الحيوانات المعالجة بعد ازالة المبايض يلاحظ قلة التغيرات النسيجية.

المصادر Reference

1- Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE.(2000): localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. J Clin Endocrinol Metab ;85:883-889 .
2- Almeida M., L. Han, M. Martin-Millan, L.I. Plotkin, S.A. Stewart, P.K.Roberson, S. Kousteni, C.A. O'Brien, T. Bellido, A.M. Parfitt, R.S.Weinstein, R.L. Jilka and S.C.Manolagas (2007): Skeletal involution by age- associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids.J Biol Chem. 282 (37): 27285-97.
3- Al-Sowyan N. S. and Nadia H. Mahmoud (2010) The Effect of Folic Acid Supplementation on Osteoporotic Markers in Ovariectomized Rats. Egypt. Acad. J. biolog. Sci., 2(2): 11 – 20.
4- AL-Zubaidi,A.H.(2007).Comparative study between the prophylactics effects of aqueous extract of black currant (vitis vinferia.L)Concentration and vitamin E on some biological parameters related with heart disease in oxidative stressed rats.MSc.Thesis College of veterinary Medicine,University of Baghdad.
5- Arsalan, H., A. Ketani, A. Gezici, A. Kapukaya and S. Necmioglu et al., 2003. The effects ofosteoporosis on distraction osteogenesis: An experimental study in an ovariectomized rabbit model. Acta Orthp. Belg., 69: 67-73.
6- Asuncion, M.; Calvo, R.M.; San Millan, J.L. et al "A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain" J. Clin. Endocrinol. Metab; (2000)85(7): 2434-8.
7- Basu, S.; Michaelsson, K.; Olofsson, H.; Johansson, S.; Melhus , H 2001. Association between oxidative stress and bone mineral density. Biochem. Biophys. Res. Commun., 288, 275–279.
8- Batlle D.C. (1986).Characterization of defects in collecting tubule acidification.kidney Int.30:546-54.
9- Bojrab ,M.J. (1998) .Current Techniquws in Small Animal Surgery (4th ed.) Lippincott Williams and Wilkins. Pp .790.
10- Boling EP 2004. Secondary osteoporosis: underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. Clin Ther.;26:1-14.
11- Bourrin,S.;Ammann,P.;Bonjour,J.P.;Rizzoli,R(2002). Recovery of proximal tibia bone mineral density and strength, but not cancellous bone architecture, after long-term bisphosphonate or selective estrogen receptor modulator therapy in aged rats. Bone, 30, 195–200.
12- Cagnacci A., F. Baldassari, G. Rivolta, S. Arangino and A. Volpe (2003): Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. Bone.33(6):956-9.
13- Canalis, E.; Giustina, A.; Bilezikian, J.P(2007). Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis.N. Engl. J. Med., 357, 905–916.
14- Castaneda, S., E. Calvo, R. Largo, R. Gonzalez-Gonzalez and C. de la Pierda et al., 2008. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. J. Bone Miner. Metabolism., 26: 53-59.
15- Chaudiere, J.; Ferrari-Illiou, R(1999). Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem. Toxicol., 37, 949–962.
16- Chavassieux P, Garnero P, Duboeuf F, Vergnaud P, Brunner- Ferber F, Delmas PD, Meunier PJ (2001) Effects of a new selective estrogen receptor modulator (MDL 103,323) on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and densitometric study. J Bone Miner Res 16:89–96.
17- Coxam V. (2005): New advances in osteoporosis nutritional prevention. Med Sci (Paris). 21(3):297-301.
18- Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD (2000). Oral statins and increased bone mineral density in postmenopausal women . Lancet;355:2218-9.
19- Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, et al, (2007) The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. FASEB J 21: 2949- 2960.

20- Fazliana M, Ramosa NL, Lüthjea P, Sekikubo M, Holm A, Nazaimoon WMW, Braunera A (2011). Labisia pumila var. alata reduces bacterial load by inducing uroepithelial cell apoptosis. J Ethnopharmacol., 136(1): 111-116.
21- Fujimoto, T., R. Kitazawa, S. Maeda, K. Mizuno and S. Kitazawa et al., 2001. BMP-3 mRNA expression during endochondral ossification of mouse bone tissue. Acta Histochem. Cytochem.,
22- Gass M, Dawson-Hughes B. (2006) :Preventing osteoporosis-related fractures: on overview. Am J Med.;119:3S-11S.
23- Ganon W.(1997):Review of medical physiology.18th ed.USA.P437.
24- Gibbens, E.E. Schulz and M.E. Carlson et al., 1998. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. Am. J.Physiol. Endocrinol. Metab., 255: E416-E421.
25- Haidong Liang, Fang Yu, Zhihong Tong and Zaiguo Huang(2011). Effect of Cistanches Herba Aqueous Extract on Bone Loss in Ovariectomized Rat., 25:361–371.
26- Hamed G M, Bahgat N M, El-Agaty S M, Soliman G Z A, Emara M M 2010.Effects of a soybean protein diet on ovariectomized female albino rats subjected to myocardial infarction . Singapore Med J; 51(10) : 781.
27- Higuchi ,Y. (2004).Glutathion depletion –induced chromosoomal DNA fragmentation associated with apoptosis and Neerosis .J. Cell Mol. , 8(4):455-464.
28- Hughes DE, Boyce BF 1998. Estrogen transforming growth factor-beta, and the regulation of bone metabolism in health and disease. The Endocrinologist; 8:55-61.
29- Iwamoto J., T. Takeda, S. Ichimura and M. Uzawa (2003) : Early response to alendronate after treatment with etidronate in postmenopausal women with osteoporosis . Keio J Med .52(2):113-9.
30- Johnson , B.D. ;Zheng ,W.;Korach , K.S. ; Scheur , T. ; Catterall,G.M. (1997). Increased experssion of the cardiac L-type calcium Channel in Estrogen receptor – deficient Mice rockefeller U.Press 110 (2):135-140.
31- Jovanovic,J. and jovanovic, M.(2004).Lipid disturbance at workers professionally exposed to industrial noise. Jugoslovenska MedicinkaBiohemija, 23(1): 69-73.
32- Kamran Kaveh, Rashid Ibrahim, Mohd Zuki AbuBakar and Tengku Azmi Ibrahim (2010) Osteoporosis Induction in Animal Model. American Journal of Animal and Veterinary Sciences 5 (2): 139-145 .
33- Karim E, Jaafar HZE, Ahmad S (2011). Phenolics and flavonoids profiling and antioxidant activity of three varieties of Malaysian indigenous medicinal herb Labisia pumila Benth. J. Med. Plants Res., 5: 1200-1206 .
34- Khudiar,K.K.(2000).The role of aqueous extraction of olive(Allium Sativum) in ameliorating the effects of experimentally induced atherosclerosis in rats .Ph.D .Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad .
35- Kim D.J., B.L. Park, J.M. Koh, G.S. Kim,L.H. Kim, H.S. Cheong, H.D. Shin,J.M. Hong, T.H. Kim, H.I. Shin, E.K.Park and S.Y. Kim (2006): Methionine synthase reductase polymorphisms are associated with serum osteocalcin levels in postmenopausal women. Exp Mol Med. 38(5):519-24 .
36- Kubo, T., T. Shiga, J. Hashimato, M. Yoshioka and H. Honjo et al., 1999. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., 68: 197-202 .
37- Lane, D.E. (2006)"Polycystic ovary syndrome and its differential diagnosis" Obstet. Gynecol. Surv.; 61(2) : 125-35.
38- Lane, N.E., W. Yao, M. Balooch, R.K Nalla and G. Balooch et al., (2006). Glucocorticoid-Treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in Placebo-treated or estrogen deficient mice. J. Bone.
39- Levasseur R. (2009): Bone tissue and hyperhomocysteinemia . Joint Bone Spine. 76(3):234-40.

40- Li X, Ominsky MS, Warmington KS, et al, 2009 Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res 24: 578-588 .
41- Mabuchi M.(1996). Pharmacological intervention and LDL of fauclical hypercholesterolemia. A.P.J.C.N., 5(4), 4-7.
42- Maggio, D.; Barabani, M.; Pierandrei, M.; Cristina Polidori, M.; Catani, M.; Mecocci, P.;Senin, U.; Pacifici, R.; Cherubini, A(2003). Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: Results of a cross-sectional study. J. Clin. Endocrinol. Metab., 88, 1523–1527.
43- Manolagas S.C. (2010): From Estrogen- Centric to Aging and Oxidative Stress:A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. [Epub ahead of print] Endocr Rev.
44- Meyer ,M. ; Capuco ,A.; Boisclair ,Y. &Van Amburgh , M. (2006). Estrogen– dependent responses of the prepubertal daitry Menopause .Int. ; 14(3):111-16 .
45- Michael ,S.(2007).Iron overload cardiomyopathy .Associated with iron overload conditions health .J. ;11(3):1-6 .
46- Namkung – Matthai , H., R. Appleyard, J. Jansen, J. Haolin and S. Maastricht et al., (2001). Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. Bone, 28: 80-86.
47- Norhaiza M, Maziah M, Hakiman M (2009). Antioxidative properties of leaf extracts of a popular Malaysian herb , Labisia pumila. J. Med. Plants Res., 3: 217-223 .
48- Norman A.W.;Mircheff A.K. and Adams T.H. (1970): Biochem . Biophys .Acta,251,343 .
49- Pennisi P, Trombetti A, Rizzoli R(2006.) Glucocorticoid- induced osteoporosis and its treatment. Clin Orthop Relat Res.;443:39-47.
50- Presnell,J.&Schreibman , M.(1997). Humason's animal tissue techniques , 5th ed .John Hopkins .Univ. Press , Balfimore ,596
51- -Poh Su Wei Melissa1, Visneswaran Navaratnam2 and Chia Yoke Yin1(2012): Phytoestrogenic property of Labisia pumila for use as an estrogen replacement therapy agent African Journal of Biotechnology Vol. 11(50), pp. 11053-11056, 21 June .
52- Rejnmark L, P. Vestergaard, A.P.Hermann, C. Brot, P. Eiken and L.Mosekilde (2008): Dietary intake of folate, but not vitamin B2 or B12, is associated with increased bone mineral density 5 years after the menopause: results from a 10-year follow-up study in early postmenopausal women. Calcif Tissue Int. 82(1):1-11 .
53- Rober-Gayon,P.R(1972):Plant phenolic.Oliver and Boyd . Edinburgh . 254 pp .
54- Rodan GA 1996. Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. In: Marcus R, Feldman D,Kelsey J (eds) Osteoporosis. Academic Press, San Diego, CA;:28-299.
55- Streeten EA, McBride D, Puffenberger E, et al, 2008 Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: description of 9 new cases and beneficial response to bisphosphonates. Bone 43: 584-590 .
56- TANG Yong-Bo, WANG Qian-Lei, ZHU Bing-Yang, HUANG Hong-Lin, LIAO Duan-Fang (2005) : Phytoestrogen genistein supplementation increases eNOS and decreases caveolin-1 expression in ovariectomized rat heartsActa Physiologica Sinica, 57 (3): 373-378
57- Tian ,H. ;Liange ,J.&Zhang ,X. (1991).Malondialdehyde - modified low density lipoprotein in diabetes mellitus .Hua .I.Ko.Ta.Hsueh PAO .; 22:97-99 .
58- Townsend ,D.;Tew ,K.&Tapiero ,H.(2003).The importance of glutathione in human disease . Biomed . Pharmacotherapy (57):145-155 .
59- Tug ,N . ; Celik ,H.; Cikim ,G.; Ozcelik ,O and Ayar, A.(2006).The correlation between plasma homocystine and malondiadehyde levels in preeclampsia .Neuroendocrinolgy Letters .,24(6):445-448 .
60- Turner AS (2002) The sheep as a model for osteoporosis in humans . Vet J 163:232–239.
61- Turner AS, Alvis M, Myers W, Stevens ML, Lundy MW (1995) Changes in bone mineral density and bone - specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. Bone (NY) 17:395S–402S .

62- -Yung,Koon Yu Samuel. (2001)Effects of Green Tea on Bone Loss in Mature Ovariectomized Rat. For the degree of Master of Medical Sciences at the University of Hong Kong ìn August.
63- Walker HA, Dean TS, Sanders TA, Jackson G, Ritter JM(2001)،-Chowienczyk PJ. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17β- estradiol .. Circulation; 103: 258-262 .
64- Weitzmann ,M.&Pacifici ,R. (2006). Estrogen deficiency and bone loss :an inflammatory tale . J.Clin .Invest . ;116 (5):1186-1194 .
65- Whitechead ,S.&Nussey ,S.(2001).Endocrinology :an intergrated approach .Oxford :BIOS :Taylor & Francis .ISPN. 1-85996 -25-1 .
66- Wohaieb ,S.; Tohala ,S.&AL-Dewachi ,D. (1994).Effect of induced . Iraq .J. Vet.Sci .; 7 :81-84 .
67- -Vanned HK, Laitala-Leinonen T.(2008):Osteoclast lineage and function. Arch Biochem Biophys.؛
68- Yen ,S. ;Jaffe , R.; Barbieri ,R. (1999).Reproductive endocrinology .4th ed . Philadelphia :Saunders . 110-133 ;301 -319;751-784 .