The effective dose of phytoestrogen extracted from bean plant on osteoblast

الجرعة المؤثرة ED_{50} للاستروجين النباتي المستخلص من نبات الفاصوليا على الخلية بانية العظم

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

الخلاصة

استخرجت الجرعة المؤثرة ED_{50} للاستروجين النباتي،حيث صممت التجربة با لتوزيع العشوائي ل48 من اناث الارانب الى ستة مجاميع (8 / مجموعة) حقنت المجموعة الاولى بالمحلول الملحي واستخدمت مجموعة سيطرة (G1) فيما حقنت عضليا حيوانات المجموعة الثانية بجرعة 0.07 ملغم / كغم من الاستروجين النباتي (G2) وحيوانات المجموعة الثالثة بجرعة 0.1 mg/kg (G3) والرابعة بجرعة 0.2 mg/kg (G4) والخامسة بجرعة 0.5 mg/kg (G5) والسادسة بجرعة 0.7 mg/kg (G6) يوميا ولمدة اربعة اسابيع.بعدها تم قياس بعض المعايير الوظيفية مثل (الكولسترول الكلي Total Cholesterol(TC) ، الشحوم البروتينية العالية الكثافة High lipoprotein density(HDL) وحددت الجرعة المؤثرة وكانت 0.2 mg/kg .

تم دراسة الفعالية الحيوية لخلايا العظم بعد المعاملة بالاستروجين النباتي على الوسط الزرعي لخلايا بانية العظم ،تم تقدير تركيز الاستروجين المؤثر على حيوية خلية العظمية وباستخدام تراكيز تصاعدية(400,200,100,50,25,12.5 مايكروغرام / مل) ولمدة 24 ،48 ،72 ساعة .وجد تركيز 50 مايكروغرام هو الاكثر فعالية واقل سمية . غير ان تاثير جرعة 25 مايكروغرام كانت الاكثر فعالية في تنشيط جينات انتاج الكولاجين .اما بالنسبة لدراسة تأثير الاستروجين النباتي على فعالية جينات الكولاجين والفايبرونكتين لوحظ زيادة لنشاط الخلايا العظمية وهي الكولاجين وهي الجينات المسؤلة عن بناء المادة البينية للنسيج العظمي وكذلك بعض الجينات المسؤلة عن بناء بروتينات غشاء الخلية التى تعمل على التصاق الخلايا العظمية بالمادة البينية Fibronectin وان هذه الجينات تقلل من عملية الموت المبرمج للخلايا .

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 of osteoblasts Osteoblast cells (in vitro). Through study some parameters genetic and some standards Plant estrogens extracted from white kidney beans, and then extracted effective dose ED50-estrogenic plant, designed the experiment and that Ba for the distribution of random for 48 of the female rabbits into six groups (8 / group) were injected into the first group with saline and used a control (G1) with injected intramuscularly second group 0.07 mg / kg of plant estrogens (G2) and the third 0.1 mg / kg (G3) and fourth 0.2 mg / kg(G4 and the fifth 0.5 mg / kg (G5) and sixth 0.7 mg / kg (G6) daily for four weeks then was measured some occupational standards (such as total cholesterol Total Cholesterol (TC) , high-density lipid protein High lipoprotein density (HDL) and identified the effective dose was 0.2 mg/ kg .Been studying the biological activity of bone cells after estrogen treatment plant at the cells osteoblasts, has been influential estimate the concentration of estrogen on bone and vital cell concentrations using upward (400,200,100,50,25,12.5, micrograms / ml) for 24, 48 and 72 hours. found a concentration of 50 micrograms is the most effective and less toxic. But the study showed that the effect of dose of 25 micrograms was the most effective in activating genes that produce collagen. As for the study of the effect of plant estrogens on the effectiveness of genes collagen and fibronectin observed increase of the activity of bone cells, a collagen, a gene responsible for a building material intra-tissue bone, as well as some of the genes responsible for a building cell membrane proteins, which works on the adhesion of bone cells to Article interfaces Fibronectin and that these genes reduces the process of programmed cell death .

المقدمة Introduction

تعتبر الاستروجينات النباتية من المركبات النباتية الطبيعية التي تتميز بفعاليتها estrogenic and/or anti estrogenic ،و يعتبر الاستروجين النباتي 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 والسبانخ وفول الصويا وغيرها من الحبوب (17,23).

ء 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 (24, 21). الفاصوليا البيضاء هي الاسم الشائع لبذور نبات كبير متنوع الاجناس من فصيلة البقوليات فصيلة القرنيات (Leguminosae) وغيرها وكلها تنتمي لنوعية نباتية واحدة والاسم العلمي لها (Phasedus Vulgaris). (22) .

وللفاصوليا فوائد علاجية كبيرة حيث تساعد على تنشيط ضربات القلب وتستعمل في معالجة التهابات المفاصل والروماتيزم وكذلك فوائدها في منع تاكسد الدهون بالدم وتعمل على خفض الكولسترول بالدم وذلك لانها غنية بالالياف الذائبة وفي معالجة امراض الكلى وهي منشطة للطاقة الجنسية وغيرها (5)،(11) . تعمل الاستروجينات النباتية كعمل الهرمون الانثوي وهي مجموعة متنوعة وطبيعية تظهر تراكيب تشابه الاستراديول (17-B- estradiol) لذلك تسبب التأثير الاستروجيني (13, 25) .العلاج البديل بالاستروجين الصناعي يكون ذا تأثيرات جانبية ضارة كثيرة ويسبب مشاكل كبيرة وامراض متعددة حيث يزيد من الاصابة بسرطان الرحم وسرطان الثدي (7، 15) .

تعتبر الخلية بانية للعظم Osteoblast وهي احد انواع خلايا العظم المسؤولة عن انتاج المادة الاساس للعظم matrix وان هذه الخلايا تقع على السطح الخارجي للعظم وتكون متمايزة ومكعبة الشكل وهي تفرز بروتينات كولاجينية مثل الكولاجين نوع Collagen type I وكذلك تفرز بروتينات غير كولاجينية (12) .

وتكون الخلايا بانية العظم الناضجة هي المسؤولة عن افراز العديد من العوامل منها (Alkaline Phosphate (ALP , Collagenase , Fibronectin , Osteocalcin)، ووجود هذه العوامل خصوصا (ALP , Osteocalcin) في مصل الدم تعتبر كدلالات قياسية لتكوين العظم (16) .

ان الخلايا البانية العظم Osteoblast تفرز المادة بين الخلوية التي تعطي صلابة للمادة الاساس حيث تزيد من معدن العظم وعندها تدعى المادة الاساس Osteoid اي شديدة الصلابة من المعادن وهنالك الكثير من المستقبلات منها الهرمونات والسايتوكينات لخلية بانية العظم،و للخلايا البانية للعظم القدرة على السيطرة لتتمايز لخلايا ناقضة العظم osteoclast بواسطة افراز عامل محفز macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) وكذلك المستقبل RANK والمرتبط RANKL) (9) ،وان خلايا بانية العظم تملك مستويات عالية للارتباط بانزيم(alkaline phosphatse(ALP حول الغشاء والتي تلعب دور مهم في زيادة المعادن للعظم (19).**ولاهمية الاستروجين جاء هدف هذه الدراسة باستخلاص الاستروجين النباتي وايجاد الجرعة المؤثرة على خلايا بانية العظم .**

المواد وطرق العمل Material and methods

بعد استخلاص الاستروجين النباتي phytoestrogen من الفاصوليا البيضاء المجففة المتوفرة بالأسواق حيث تم الاستخلاص حسب الطريقة المتبعة من قبل (18) .صممت هذه التجربة لايجاد الجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي phytoestrogen على بعض المعايير الحيوية لاناث الارانب ،اذ استخدمت جرع تصاعدية مختلفة من مستخلص الاستروجين النباتي بطريقة الحقن. حيث قسمت عشوائيا 48 من اناث الارانب المحلية Oryctatagus cuniculus والتي يتراوح معدل أوزانها مابين (1500 – 2000) غرام و تراوحت أعمارها بين (8-9) أشهر. وصممت تجربة لايجاد الجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي وذلك با لتوزيع العشوائي 48 من اناث الارانب الى ستة مجاميع (8 / مجموعة) بقياس بعض المعايير الوظيفية وهي الكولستيرول الكلي والشحوم البروتينية العالية الكثافة ، وحددت الجرعة المؤثرة وكانت (0.2 mg/kg) .وقد تم قياس الفعالية الحيوية للخلايا cell viability assayحيث تم اجراء اختبار (Microtiter plate colorimetric assay(MTT لقياس الفعالية الحيوية للخلايا العظمية بعد المعاملة بالاستروجين النباتي ,مخففة بالوسط الزرعي وبتراكيز تصاعدية (400,200,100,50,25,12.5 مايكروغرام / مل) لمدة (24, 48 ,72 ساعة) تحت اضافة 10 مايكرولتر من محلول ال mtt بتركيز 5 ملغرام/ مل مخفف في المحلول المنظم للفوسفات pBs وتم حفظ الخلايا بالحاضنة لمدة 4 ساعات بعدها ازيل المحلول وتمت اضافة DMSO والقراءة عند الطول الموجي 570nm بجهاز قياس الكثافة الضوئية micro plate reader وقد تم استخدام استخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الاني RT.PCR لقياس نشاط جينات الكولاجين نوع الاول وجين الفايبرونكتين. تم تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم بالطريقة الإنزيمية وفقاً لطريقة (1) ، تم تقدير تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL بالطريقة الإنزيمية وفقاً لطريقة (3)، وتم استخدم اختبار student t-test للاستدلال على الدلالة المعنوية، كما استعمل المعامل المعنوي الأصغر(Least Significance Difference (LSD 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

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. وكما يلي 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 كما مبين في الجداول (1 ،2)،. لقد بينت النتائج ان هناك تأثير معنوي للمستخلص على الصفات المذكورة وبمستويات معنوية مختلفة اشارت النتائج الى تاثير معنوي ($P<0.05$) في مستوى الكولسترول عند معاملة اناث الارانب بمستخلص الاستروجين النباتي .لقد استخدمت الجرع التصاعدية (0.07 ،0.1 ، 0.2 ،0.5 و 0.7 ملغم/كغم من المستخلص لحقن الحيوانات لمدة اربعة اسابيع متتالية. يبين الجدول (1) ان الانخفاض في مستوى الكولسترول كان معنويا ($P<0.05$)في الاسبوع الثالث مقارنة مع الاسابيع الاخرى.

جدول (1) تأثير الجرع المختلفة من مستخلص الاستروجين النباتي على تركيز الكولستيرول الكلي Total Cholesterol(TC) (mg/dl)في مصل اناث الارانب المحلية

G6 0.7 mg / kg	G5 0.5 mg / kg	G4 0.2 mg / kg	G3 0.1 mg / kg	G2 0.07 mg / kg	G1	المجاميع / الفترة الزمنية
126.86 A ±7.60 a	127.01 A ±8.10 a	126.37 A ±5.30 a	125.99 A ±8.34 a	126.30 A ±11.01 a	126.76 A ±10.98 a	الاسبوع الاول
116.80 B d ±6.90	119.05 B d ±7.54	120.67 B c ±5.03	121.41 A b ±5.11	126.01 A a ±10.43	127.80 A a ±10.00	الاسبوع الثاني
95.2 C d ±7.88	99.5 C c ±6.31	110 C c ±6.84	118.20 B b ±7.98	127.90 A a ±8.22	127.1 A a ±11.01	الاسبوع الثالث
99.80 D d ±8.4	100.11 C d ±7.41	114.38 C c ±7.73	120.11 A b ±7.37	128.81 B a ±12.01	126.92 A a ±10.63	الاسبوع الرابع

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 $p<0.05$.

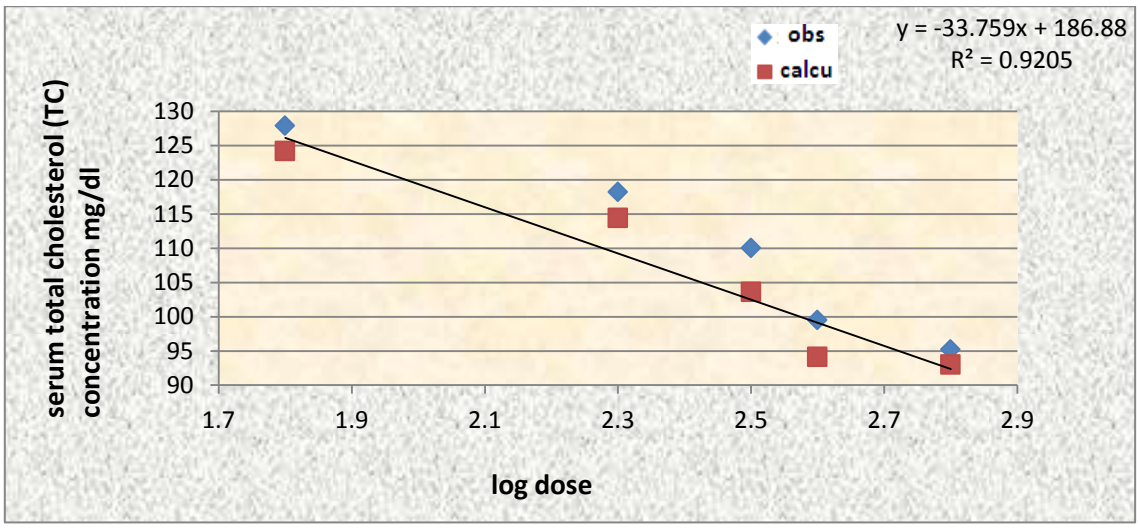
جدول (2) يبين تأثير الجرع المختلفة من المستخلص للاستروجين النباتي على مستوى الشحوم البروتينية عالية الكثافة High Density Lipoproteins (HDL) اذ لوحظ زيادة معنوية ($P<0.05$) لمدة شهر وعلى مستويات مختلفة فيما عدا مجموعة G و(G1 0.07 mg/kg) .كما لوحظ زيادة معنوية في مستوى الشحوم البروتينية عالية الكثافة لمجموعة الحيوانات التي حقنت عضليا 0.1 ، 0.2 ،0.5 و 0.7 mg / kg(للأسابيع الثاني والثالث والرابع مقارنة مع مجموعة G1 و G .وان الزيادة المعنوية لم تكن معنوية للأسبوع الرابع بين المجاميع مقارنة مع الاسبوع الثالث .

جدول (2) تأثير الجرع المختلفة من مستخلص الاستروجين النباتي على تركيز الشحوم البروتينية العالية الكثافة HDL (mg/dl) في مصل اناث الارانب المحلية

G6 0.7 mg / kg	G5 0.5 mg / kg	G4 0.2 mg / kg	G3 0.1 mg / kg	G2 0.07 mg / kg	G1	المجاميع / الفترة الزمنية
51.00 A ±3.01 a	50.03 A ±2.75 a	49.66 A ±3.11 a	50.11 A ±2.81 a	49.78 A ±2.11 a	50.60 A ±2.49 a	الاسبوع الاول
59.00 B ±2.06 c	57.98 B ±1.98 c	56.80 B ±2.90 c	53.91 A ±2.88 b	51.85 A ±3.00 b	49.11 A ±3.11 a	الاسبوع الثاني
66.21 C ±3.14 c	67.14 C ±3.90 c	60.20 C ±3.38 d	28.28 B ±2.70 c	52.20 A ±3.79 b	50.90 A ±2.55 a	الاسبوع الثالث
65.08 C ±2.90 c	66.15 C ±3.06 c	59.00 C ±4.33 b	56.66 A ±3.47 b	52.99 A ±2.56 a	51.03 A ±3.10 a	الاسبوع الرابع

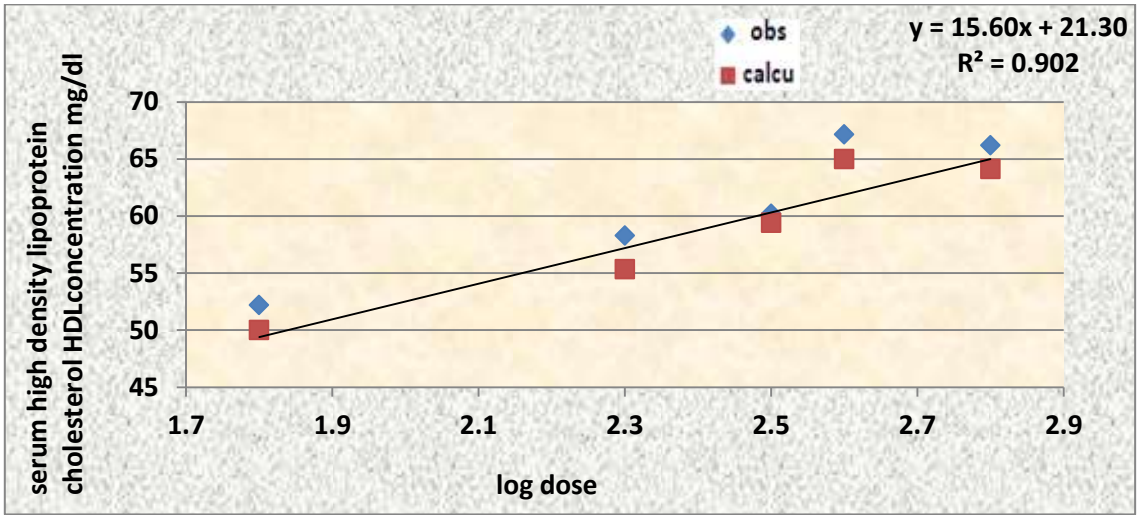
القيم تدل على المعدل ± الخطأ القياسي (n=8) لكل مجموعة،الحروف المختلفة الكبيرة عموديا تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى $p<0.05$ ،الحروف المختلفة الصغيرة افقيا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى $p<0.05$.

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 .

من 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 .



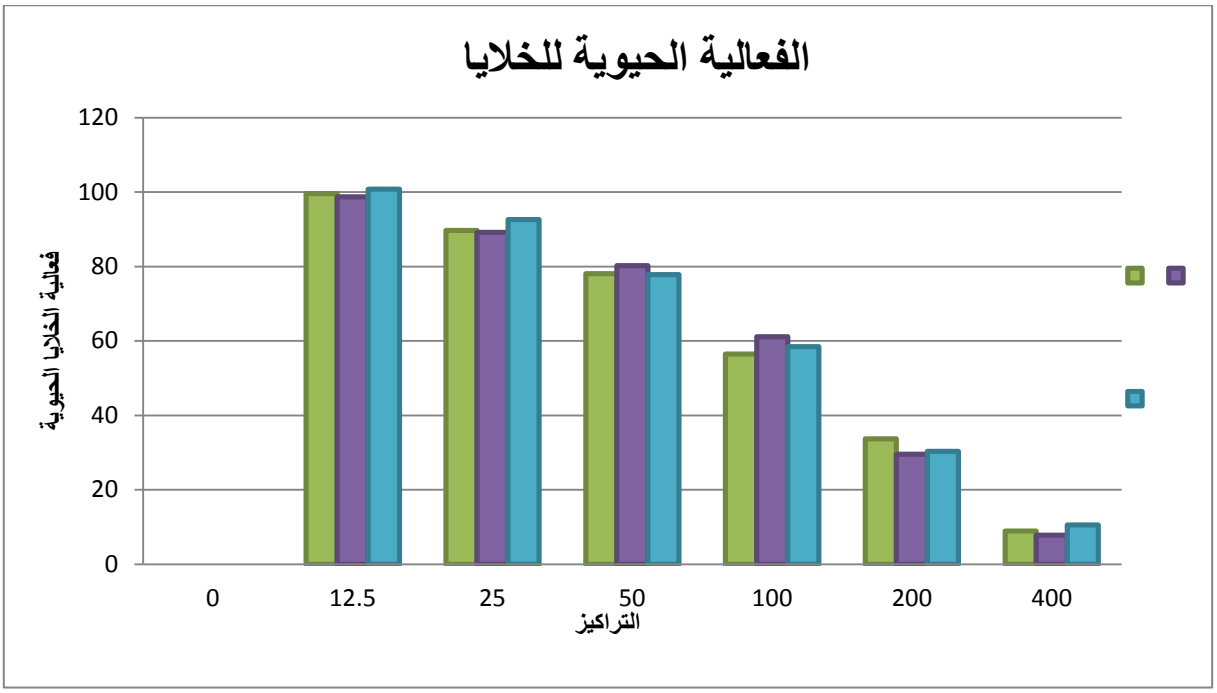
شكل (2) تأثير الجرع المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أناث الارانب البالغة. n=8 لكل مجموعة ED50=0.2 mg/kg .

ومن خلال الشكلين (1) ،(2) تم حساب ED50 للمستخلص ß-17 Estradiol من خلال حساب معدل الجرع المؤثرة لل TC، HDL والتي بلغت 0.2mg/kg .

في حالة ازالة المبايض جراحيا عند النساء وهي المصدر الرئيسي للاستروجين يتراجع الهرمون لتظهر اعراض سن اليأس(8);(4) .و اشارت الدراسات (10,2) 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.

ان مستوى هرمون الاستروجين في مصل دم الارانب مزالة المبايض وصل الى مستويات منخفضة ولم يختفي تماما من مصل الدم وذلك لوجود مصادر اخرى تصنعه وبشكل محدود مثل قشرة الغدة الكظرية وكذلك المواقع الرئيسية الاخرى لانتاج الاستروجين هي الانسجة الدهنية Adipose Tissue ،الجلد، والعضلات وغيرها لها القدرة على تحويل C19 Steroid الى C18 Stertoids ولكنها تفقد القدرة على بناء وتصنيع C19 Precursors الاولي او البدائي وانما تعتمد على C19 Steroids الدائر لتصنيع الاستروجين (20).

وقبل البدء بدراسة تأثير الاستروجين النباتي على وظيفة الخلية البانية للعظم باستخدام الزراعة النسيجية ،تم تقدير تركيز الاستروجين النباتي الذي يؤثر على حيوية الخلايا.تمت معاملة خلايا العظم Osteoblast بتراكيز تصاعدية (12.5 ألى 400 مايكروغرام / مل) من المستخلص النباتي لمدة 24، 48، 72 ساعة .لقد بينت النتائج ان حيوية الخلايا تنخفض بمقدار 20% عند تركيز 50 مايكروغرام /مل من الاستروجين النباتي .وقد اعتبرنا ان هذا التركيز هو اعلى تركيز غير سام للخلايا maximal non toxic dose ويطلق عليه اختصارا ب MNTD .لذلك استخدم هذا التركيز من التجارب اللاحقة حيث تكون النسبة المئوية للفعالية الحيوية للخلايا تقريبا 80% وهو مايسمح بدراسة تأثير المستخلص على وظيفة الخلايا العظمية.

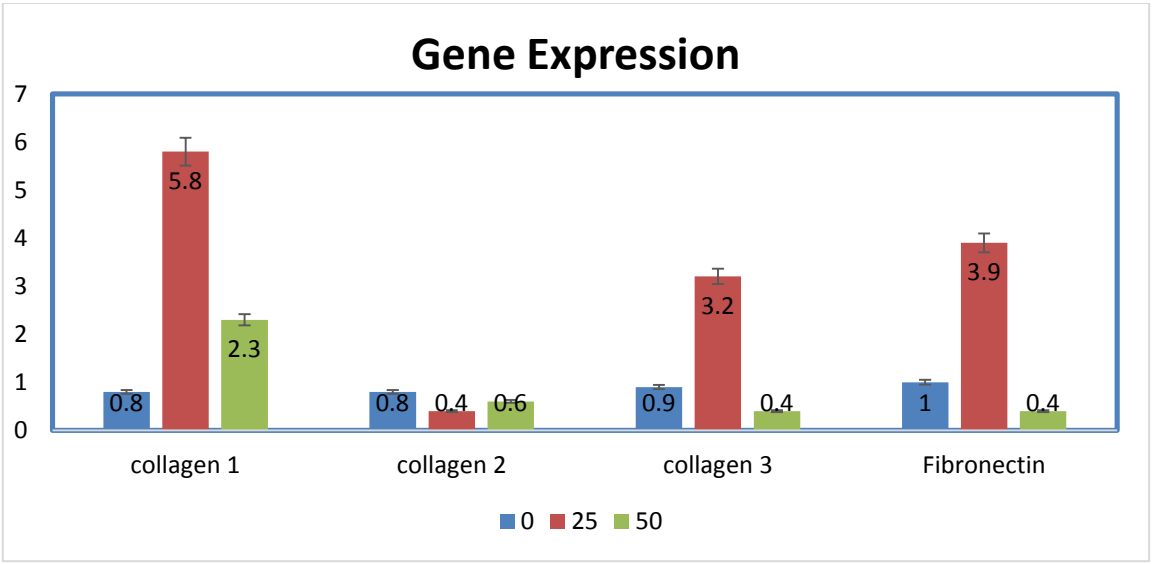


شكل(3) يبين الفعالية الحيوية للخلايا وبتراكيز تصاعدية للاستروجين النباتي

استخدمت خلايا العظم Osteoblast لدراسة تأثير الاستروجين النباتي على فعالية جينات الكولاجين نوع I والفيبرونكتين في بادئ الامر تم معاملة الخلايا بتركيز واطئ (25 مايكروغرام /مل) وتركيز عالي (50مايكروغرام /مل) وهذه التراكيز هي اقل او تساوي قيمة MNTD المحددة في التجربة السابقة (Cell viability) .

اشارت النتائج الى ان فعالية جين الكولاجين ارتفعت بشكل بارز نتيجة المعاملة بالاستروجين النباتي مقارنة بمجموعة السيطرة control .ايضا بينت النتائج ان الاستجابة للاستروجين النباتي من قبل خلايا العظم كانت الاعلى عند تركيز 25 مايكروغرام / مل مقارنة بتركيز 50مايكروغرام /مل .هذه النتائج تشير بوضوح الى ان الجينات المميزة لنشاط الخلايا العظمية وهي الكولاجين قد ارتفعت بعد المعاملة مما ينشط انتاج بروتينات الكولاجين المهمة في بناء المادة البينية في النسيج العظمي .

وقد بينت النتائج وجود زيادة معنوية ($p<0.01$) بمستوى فعالية جين الفايبرونكتين .ان زيادة فعالية هذا الجين تؤدي بالتالي الى زيادة انتاج بروتين الفايبرونكتين من قبل خلية العظم osteoblast .وقد بينت النتائج (كما في الشكل رقم ادناه) ان تركيز 25 مايكروغرام / مل من الاستروجين النباتي ادى الى زيادة معنوية ($p<0.01$) في مستوى فعالية هذا الجين على العكس في التركيز 50 مايكرو غرام / مل والذي سبب انخفاض في مستوى فعالية الجين.



شكل (4) تاثير الاستروجين النباتي على التعبير الجيني لجينات الكولاجين والفايبرونكتين

ان الفايبرونكتين هو بروتين تنتجه الخلايا العظمية وله دور مهم في بناء المادة البينية في نسيج العظم ،يرتبط الفايبرونكتين بخلايا العظم عن طريق مستقبلات الانتكرين Integrins الموجودة في غشاء الخلية كذلك يتداخل مع الياف الكولاجين والفايبرين والبروتينات الكاربوهيدراتية مثل Heparan Sulfate Protoglycans ليكون المادة البينية لنسيج العظم .نستنتج من ذلك ان الاستروجين النباتي ادى الى زيادة انتاج المادة البينية لنسيج العظم عن طريق تحفيز الجينات المسؤولة عن انتاج الياف الكولاجين وبروتين الفايبرونكتين وبالتالي تقليل الاضرار الناتجة عن هشاشة العظام .

من المعروف ان الاستروجينات عند الجرعات العالية غالبا ما تؤدي الى نتائج عكسية ،لذلك نلاحظ في الدراسة الحالية ان الجرعة العالية من الاستروجين النباتي (50 مايكروغرام /مل) ادت الى انخفاض في مستوى انتاج الكولاجين والفايبرونكتين ($p<0.05$) مقارنة بالسيطرة .**نستنتج من الدراسة الحالية ان الجرعة المؤثرة الجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (phytoestrogen) المستخلص من حبوب الفاصولياء البيضاء الجافة له تأثير ايجابي على خلايا بانية العظم (in vitro).**

المصادر

1- Allani , I. (1974). Measurment of cholesterol . Clin. Chem. ;20:470-475.
2- Asuncion , M . ; Calvo , R.M. ; San Millan ,J.L.et al .,(2000) A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain,, J.Clin.Endocrinol.Metab;85(7):2434-8.
3- Burstein ,M. J. (1970). Measurement of HDL .Lipid Res., 11:583.
4- Chua LS,Latiff NA,Lee SY, Lee CT,Sarmidi MR,Aziz RA (2011). Flavonoids and phenolic acids from Labisia pumila (kacip Fatimah).food chem .,127:1186-1192.
5- Danil Zohary and Marria Hopf 2000.(Domestication of plants in the old world).114 ed. Philadephia v: Elsvier .Science .
6- Gass M, Dawson-Hughes B. (2006) :Preventing osteoporosis-related fractures: on overview. Am J Med.;119:3S-11S.
7- Hammond CB: Women's concerns with hormone replacement therapy–compliance issues. Fertil Steril 1994, 62:157S-160S
8- 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.
9- Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S 1999. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. BiochemBiophys Acta; 1445:134-141.
10- 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.
11- Laura Mc Ginnis and Jan Suszkiw,ARS. , 2006.(Breeding better beans) Agricultural Research magazine .June 2006.
12- 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 .
13- Mascie-Taylor, C. G. N.; Bentley, Gillian R. (2000). Infertility in the modern world: present and future prospects. Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 99–100 .
14- Meryl S. LeBoff, Rupali Narweker, Andrea LaCroix, LieLing Wu, Rebecca Jackson, Jennifer Lee, Douglas C. Bauer, Jane Cauley, Charles Kooperberg, Cora Lewis,Asha M. Thomas, and Steven Cummings (2009)Homocysteine Levels and Risk of Hip Fracture in Postmenopausal Women. (J Clin Endocrinol Metab94: 1207–1213.
15- Messina M (1995) Isoflavone intake by Japanese were overestimated.
16- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T(1997).Expression of estrogen receptor-, in rat bone.Endocrinology; 138:4509-4512 .
17- 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 .

18- Rober-Gayon,P.R(1972):Plant phenolic.Oliver and Boyd . Edinburgh . 254 pp .
19- 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
20- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ , Wooden S, Bennett L,Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R,Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E,Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D,Pattison W Campbell P, Boyle WJ 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density: Cell; 89:309-319.
21- 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.
22- United Nations ,FAO ,1994.(Definition and Classification of commodities.Women .J. Amer. Medical Associa. ;276: 1747 – 1751.
23- 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 .
24- Vanned HK, Laitala-Leinonen T.(2008):Osteoclast lineage and function. Arch Biochem Biophys.؛
25- Yildiz, Fatih (2005). Phytoestrogens in Functional Foods. Taylor & Francis Ltd. pp. 3– 5, 210–211. ISBN 978-1-57444-508-4 .