



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

تأثير الاستروجين النباتي في بعض المعايير الفسيولوجية والنسجية والوراثية لإنات الارانب المستحث فيها هشاشة العظام

اطروحة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

في علوم الحياة / علم الحيوان

من قبل

الطالبة غصون غانم كعيم

بإشراف

الدكتور حسين علوان المعموري

ا.م.د وفاق جبوري محمد البازي

جامعة ملايا- ماليزيا

جامعة كربلاء

رمضان 1435هـ

تموز 2014 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

"وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا"

صدق الله العلي العظيم

(سورة طه / الآية 114)

الإهداء

إلى من يبقى املي رضاه وغايتي حبه ورجائي غفرانه ... الله رب العالمين.
الى الضياء الذي ينير دربي ...رسول الله محمد وآله الطيبين الطاهرين .
الى من أذهب الله عنهم الرجس وطهرهم تطهيرا ... سادتي ومعتدي أهل بيت النبوة (عليهم السلام).
الى القلب الذي غمرني حبا وحنانا وعطفا ... أبي.
الى ينبوع الحب والعطاء وفيض الصبر ...عبير أنفاسي ونور طريقي ... أمي
إلى سندي في الحياة وفخري واعتزازي، الإنسان الذي وقف بجانبني وقدم لي العون لمواصلة دراستي
زوجي
إلى بهجة حياتي
أبنائي
الى من أشدد بهم عضدي ... أحبائي وأعزائي ... أخوتي وأخواتي.
والى كل قلب أحبني بصدق وإخلاص وكل يد امتدت لمساعدتي والدعاء لي بكل خطوة
أهدي ثمرة جهدي.

غصون

الشكر والتقدير

الحمد لله الذي له العزة والجبروت

لايسعني وانا انهي جهدي هذا الا ان اف ب بين يدي الله متضرعة وشاكرة لنعمه التي انعم بها علي متوجهة اليه بالشكر والحمد اعترافاً وطلباً للقبول انه نعم المولى ونعم النصير .

ويلزمني واجب العرفان والامتنان ان اتقدم بوافر الشكر والتقدير والاحترام الى استاذتي الفاضلة الدكتورة وفاق جبوري البازي لاقتراحها موضوع الرسالة ولاشرافها ومتابعتها العلمية الدؤوبة ورعايتها الكريمة ونصائحها الراقية لي طيلة مدة الدراسة ويطيب لي أن أتقدم بوافر شكري وتقديري الى الدكتور حسين علوان روضان المشرف الاستشاري للجانب الوراثي في البحث.

أود أن أتقدم ببالغ شكري وتقديري الى رئاسة جامعة كربلاء لإتاحتها الفرصة لأكمال دراستي و شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة .

و اتقدم بخالص شكري وامتناني الى الاخ اركان عدنان السعيدي من قسم العمليات والدكتور نزار جبار و محمد مهدي هادي ونبيل ابراهيم خليل من مختبر التقطيع النسيجي في مدينة الحسين الطبية وكذلك الشكر والتقدير للدكتور حسن حاكم من جامعة القادسية واود ان اشكر زميلاتي وزملائي من طلبة الدراسات العليا للتعاون ، واسال الله العلي القدير الموفية للجميع

اجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير الجرعة المؤثرة ED₅₀ للاستروجين النباتي (phytoestrogen) المستخلص من حبوب الفاصولياء البيضاء الجافة على فعالية خلايا بانية العظم Osteoblast من خلال دراسة بعض المعايير الوظيفية والوراثية في اناث الارانب المستحث فيها هشاشة العظام Osteoporosis بازالة المبايض الثنائي واعتبرت العينة داخل الجسم (in vivo) وبعض المعايير الوراثية في الوسط الزرعى لخلايا بانية العظم خارج الجسم (in vitro).

بعد استخلاص الاستروجين النباتي من الفاصولياء البيضاء، ثم استخراج الجرعة المؤثرة ED₅₀. صممت تجربة لايجاد الجرعة المؤثرة ED₅₀ للاستروجين النباتي وذلك با لتوزيع العشوائي ل48 من اناث الارانب الى ستة مجاميع (8 / مجوعة) حقنت المجموعة الاولى بالمحلول الملحي واستخدمت مجوعة سيطرة (G1) فيما حقنت عضليا المجموعة الثانية 0.07 mg/kg / لغم من الاستروجين النباتي (G2) والثالثة 0.1 mg/kg (G3) والرابعة 0.2 mg/kg (G4) والخامسة 0.5 mg/kg (G5) والسادسة 0.7 mg/kg (G6) يوميا ولمدة اربعة اسابيع بعدها تم قياس بعض المعايير الوظيفية مثل الكوليسترول الكلي Total Cholesterol (TC) و الشحوم البروتينية عالية الكثافة High lipoprotein density (HDL) , و حددت الجرعة المؤثرة وكانت 0.2 mg/kg .

بالنسبة للتجربة الثالثة قسمت عشوائيا 32 من اناث الارانب (8 / مجوعة) تركت المجموعة الاولى مجوعة سيطرة (G1) وازيلت المبايض للمجموعة الثانية (G2) وحقنت المجموعة الثالثة ب 0.2 mg/kg من الاستروجين النباتي بدون ازالة المبايض لها (G3) وعولجت المجموعة الرابعة بالجرعة المؤثرة بعد ازالة المبايض (G4). وبعد اجراء بعض المعايير الوظيفية لوحظت النتائج التالية:-

1- في مجموعة الحيوانات ازالة المبايض ولمدة ستة اشهر لوحظ انخفاضاً معنوياً (P<0.05) في مستوى هرمون الاستروجين (E) Estrogen و مستوى الكلوتاتيون المختزل Glutathion (GSH) والفسفور (P) Phosphour في صل الدم بينما لوحظ زيادة معنوية (P<0.05) في مستوى هرمون المحفز للجريبات Follicle- stimulating hormones (FSH) و LH و مستوى MDA و مستوى تركيز الكالسيوم Ca و مستوى فعالية Alkaline Phosphate (ALP) بالمقارنة مع باقي المجاميع.

2- مجموعة الحيوانات □ زالة المبايض وعولجت بعد □ رور ستة اشهر (G4) لوحظ زيادة □ عنوية (P<0.05) في □ مستوى الاستروجين E و GSH و p و انخفاضاً □ عنويا (P<0.05) في FSH و LH و MDA و Ca و ALP بالمقارنة □ مع □ مجموعة □ زالة المبايض G2 .

3- مجموعة الحيوانات التي عولجت دون ازالة المبايض G3 فقد لوحظ زيادة □ عنوية (P<0.05) في □ مستوى E و GSH و p ، وانخفاضاً □ عنويا (P<0.05) في MDA و Ca و ALP ، بالمقارنة □ مع □ مجموعة الحيوانات □ زالة المبايض G2 و □ مجموعة G4 .

4- بالنسبة للدراسة النسيجية لوحظ تدهور في النسيج العظمي بزيادة الفراغات في □ تن النسيج العظمي وتطاول في قنوات فولكمان و □ ا بالنسبة لنسيج الرحم تفكك للطبقات الداخلية للرحم وقلة في التغذية الرحمية واختزال في الغدد الرحمية بمجموعة الاناث □ زالة المبايض . وعند حقن الجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي لوحظ قلة في تدهور النسيج العظمي والرحم .

بالاضافة الى دراسة التغيرات في التعبير الجيني في المادة الوراثية لجينات الفايبرونكتين Fibronectin والكولاجين نوع I Collagen type I والمستقبل Receptor for activation of nuclear factor kappa B (RANK) في الوسط الزراعي بالزراعة النسيجية (in vitro) خارج الجسم وكذلك في داخل جسم الكائن الحي (in vivo) في الخلية العظمية .

5- اظهرت نتائج الدراسة الوراثية للتعبير الجيني العالي الواضح لجينات Collagen type I و الفايبرونكتين Fibronectin لمجموعة الحيوانات □ زالة المبايض والمعالجة والتي حقنت دون ازالة المبايض . بينما لم تظهر النتائج فروق □ عنوية لجينات □ مستقبل Receptor for activation of nuclear factor kappa B (RANK) .

□ ا بالنسبة للجزء الثاني □ ن الدراسة والمتضمن دراسة الفعالية الحيوية لخلايا العظم بعد المعالجة بالاستروجين النباتي على الوسط الزراعي لخلايا بانية العظم ، تم تقدير تركيز الاستروجين المؤثر على حيوية الخلية العظمية وباستخدام تراكيز تصاعديّة (400,200,100,50,25,12.5) □ ايكروغرام / □ ل . ولمدة 24 ، 48 ، 72 ساعة . وجد تركيز □ 50 ايكروغرام هو الاكثر فعالية واقل سمية . ولكن بينت الدراسة ان تأثير جرعة □ 25 ايكروغرام كانت الاكثر فعالية في تنشيط جينات انتاج الكولاجين □ ا بالنسبة لدراسة تأثير الاستروجين النباتي على فعالية الجينات الكولاجين و الفايبرونكتين 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 التي تعمل على التصاق الخلايا العظمية بالمادة البينية Fibronectin وان هذه الجينات تقل □ ن عملية الموت المبر □ ج للخلايا .

نستنتج من الدراسة الحالية ان الجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (phytoestrogen) المستخلص من حبوب الفاصولياء البيضاء الجافة له تأثير ايجابي على النسيج العظمي (in vivo) وخاصة خلايا بانية العظم (in vitro) .

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
I	الخلاصة	
IV	المحتويات	
VII	قائمة الجداول	
III	قائمة الأشكال والصور	
I X	قائمة المختصرات	
الفصل الأول		
المقدمة		
3-1	المقدمة	
الفصل الثاني		
استعراض المراجع		
4	الفاصولياء البيضاء	1-2
4	الاستروجين النباتي	2-2
6	خلايا العظم	3-2
9	بروتين كولاجين نوع 1	1-3-2
10	الفايبرونكتين	2-3-2
10	الهرمونات والمنظمات الاخرى للعظم	4-2
10	هرمونات الغدة جار الدرقية	1-4-2
11	فيتامين D	2-4-2
11	هرمون الكالسيتونين	3-4-2
12	هرمون الاستروجين وهرمونات القند	4-4-2
15	مرض هشاشة العظام	5-2
18	عمليات ازالة المبايض	6-2
19	سن اليأس	7-2
الفصل الثالث		
المواد وطرائق العمل		
20	العدد المستخدمة للدراسة الجزيئية	1-3
21	البيادانات	1-1-3
22	الحيوانات المستخدمة في الدراسة	2-1-3
22	تصميم التجربة	2-3
22	التجربة الاولى	1-2-3
24	التجربة الثانية	2-2-3
25	التجربة الثالثة	3-2-3
26	الفحوصات الكيموحيوية	3-3
26	تقدير تركيز المالدوندايلديهايد في مصل الدم	1-3-3
27	تقدير تركيز الكلوتاثايون في مصل الدم	2-3-3

30	تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم	3-3-3
32	تقدير تركيز الشحوم البروتينية العالية الكثافة	4-3-3
33	عينات الدم	5-3-3
33	قياس تركيز الكالسيوم	6-3-3
34	قياس انزيم ALP مصل الدم	7-3-3
34	قياس تركيز هرمون الاستروجين في مصل الدم	8-3-3
37	قياس تركيز هرمون محفز الجريبات	9-3-3
38	قياس تركيز الهرمون اللوتيني	10-3-3
38	التحضيرات النسجية	4-3
39	التصوير المجهرى	5-3
40	الدراسة الجزيئية	6-3
48	التحليل الاحصائي	7-3
الفصل الرابع		
النتائج		
49	استخلاص (لاستروجين النباتي) Phytoestrogen من حبوب الفاصولياء البيضاء المجففة	1-4
49	تحديد الجرعة المؤثرة لمستخلص الاستروجين النباتي	2-4
50	العلاقة الخطية بين تركيز المستخلص والمعايير الوظيفية لدم الارانب	3-4
52	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي Phytoestrogen في معدل تركيز الهرمونات	9-4
54	التغيرات في معدل الكلوتاثايون المختزل	10-4
55	التغيرات في مستوى ايونات الكالسيوم	11-4
56	التغيرات في معدل الفسفور	
58	التغيرات في معدل Alkaline phosphates (ALP)	
59	التغيرات النسيجية	4-4
59	تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على نسيج العظم	1-4-4
64	تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على نسيج الرحم	2-4-4
77-66	نتائج التغيرات الجزيئية	5-4
الفصل الخامس		
المناقشة		
78	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي Phytoestrogen في معدل تركيز الهرمونات	1-5
80	التغيرات في معدل الكلوتاثايون المختزل	2-1-5

84	التغيرات في مستوى ايونات الكالسيوم	3-1-5
89	التغيرات في معدل الفسفور	4-1-5
91	التغيرات في معدل Alkaline phosphates (ALP)	5-1-5
93	التغيرات النسيجية	2-5
93	تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على نسيج العظم	1-2-5
95	تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على نسيج الرحم	2-2-5
103-97	التغيرات الجزيئية	
104	الاستنتاجات	
105	التوصيات	
المصادر		
106	المصادر العربية	
107	المصادر الأجنبية	
	الملاحق	
	الخلاصة باللغة الانكليزية	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
23	العدد التي استخدمت في الدراسة	1-3
57	تأثير الجرعة المختلفة من مستخلص الاستروجين النباتي على تركيز الكولستيرول الكلي Total Cholesterol (TC) (mg/dl) في مصلى اناث الارانب المحلية	1-4
58	تأثير الجرعة المختلفة من مستخلص الاستروجين النباتي على تركيز الشحوم البروتينية العالية الكثافة HDL (mg/dl) في مصلى اناث الارانب المحلية	2-4
64	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز هرمون الاستروجين ($\mu\text{g/ml}$) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	3-4
65	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز هرمون محفز الجريبات FSH ($\mu\text{g/ml}$) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	4-4
66	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز هرمون تركيز الهرمون اللوتيني LH لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	5-4
69	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل الكلوتاثيون GSH لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	6-4
70	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز المالوندايهيد MDA لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	7-4
74	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في مستوى الكالسيوم Calcium لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	8-4
81	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في مستوى الفسفور phosphorus لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	9-4
84	تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل (Alkaline phosphates ALP) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض	10-4

قائمة الاشكال والصور

الصفحة	العنوان	لتسلسل
8	صورة 2 - توضح انواع خلايا العظم	
14	شكل يوضح تأثير الاستروجين على خلايا العظم OB-OCIF و OB-OCSF تشير الى انه تحفيز خلايا ناقضة العظم osteoclast مشتق من خلايا بانية العظم osteoblast ويشير الى عوامل التثبيط	1-2
29	صورة تبين إجراء عملية إزالة المبايض في الأرانب	1-3
61	شكل يبين تأثير الجرعة المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الكوليستيرول الكلي (TC) بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أنثى الارانب البالغة	1-4
62	شكل يبين تأثير الجرعة المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أنثى الارانب البالغة	2-4
62	شكل يبين تأثير الجرعة المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الكلوتاثيون المختزل Glutathion (GSH) بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أنثى الارانب البالغة	3-4
63	شكل يبين تأثير الجرعة المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز المالوندايالديهيد Malondialdehyde (MDA) بالمصل بعد اربعة اسابيع للمعالجة في أنثى الارانب البالغة	4-4
88	صورة لمقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة حيوانات السيطرة G1	5-4
88	صورة لمقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة الحيوانات مزالة المبايض (OVX) G2	6-4
89	صورة لمقطع نسيجي لعظم الفخذ للحيوانات المعالجة G3	7-4
89	صورة لمقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة الحيوانات المعالجة بعد ازالة المبايض G4	8-4
92	صورة لمقطع نسيجي للرحم في مجموعة حيوانات السيطرة G1	9-4
92	صورة لمقطع نسيجي للرحم لمجموعة الحيوانات مزالة المبايض (OVX) G2	10-4
93	صورة لمقطع نسيجي للرحم لمجموعة الحيوانات المعالجة بدون ازالة المبايض G3	11-4
93	صورة لمقطع نسيجي للرحم لمجموعة الحيوانات المعالجة بعد ازالة المبايض G3	12-4
95	شكل يمثل نتائج استخلاص RNA	13-4
97	شكل يمثل منحنى التضخم للجين المحافظ B-actin	14-4
99	شكل بياني للتعبير الجيني النسبي للكولاجين نوع 1 الى الجين القياسي B-actin بواسطة قياس Real time PCR .	16-4
100	شكل يمثل منحنى التضخم لجين الفايبرونكتين	18-4

101	شكل بياني للتعبير الجيني النسبي للفايبرونكتين الى الجين القياسي B-actin بواسطة قياس Real time PCR .	19-4
102	شكل يمثل منحنى التضخم لجين Kappa-B	21-4
103	شكل بياني للتعبير الجيني النسبي Kappa-B الى الجين القياسي B-actin بواسطة قياس Real time PCR .	22-4

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ALP	Alkaline Phosphate
APOE	Apolipo Protein E Genotype
BMC	bone mineral content
BMD	Bone Mineral Density
Ca	Calcium
CVD	Cardiovascular Disease
COL 1A1	Collagen type I
CHD	Coronary Heart Disease
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
E4	Esterol
E2	Estradiol
E3	Estriol
ER	Estrogen Receptor
ER- α	Estrogen Receptor alpha
ER-B	Estrogen Receptor Beta
E1	Estrone
FSH	Follicle Stimulating Hormone
(FSH	Follicle- stimulating hormones
HDL	High Density Lipoprotein
HRT	Hormone Replacement Therapy
IL-6	Interleukin -6
IL-1	Interleukin-1
(IOF	International Osteoporosis Foundation
(LBM)	Low Bone Mass
LRP5	Low-density Lipoprotein Receptor- related Protein5
LH	Luteinizing hormone
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MAD	Malondialdehyde

National Institute Health	NIH
Oestrogen receptor 1 and receptor activator of NF-Kappa-B,	(RANK), RANKL
Osteoprotegrin	OPG
Overiectomized	OVX
Paired Helics Fibers	PHFs
Parathyroid gland hormone	(PTH)
Polymerase Chain Reaction	PCR
Polymerase Chain Reaction	PCR
Polyunsaturated Fatty Acids	PUFAs
Reactive Oxygen Species	ROS
Reactive Oxygen Species	ROS
Reduced glutathione	GSH
Selerotin	SOST
Sulphydryl Group	SH
Super Oxide anion	SOD
Super Oxide anion	SOD
Tartrate –Resistant acid phosphate	TRAP
Total Cholesterol	TC
Tumor Necrosis Factor α –	TNF-α
World health organization	WHO

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة Introduction

يعد مرض هشاشة العظام (osteoporosis) مرضاً صامتاً يصيب الإنسان لسنوات متعددة من دون الكشف عنه , وهو النقص في كتلة العظم bone mass الذي يؤدي الى سهولة كسره خاصة في منطقة الورك والعمود الفقري (Gass and Dawson ,2006) ،ينتشر مرض هشاشة العظام في العالم اذ يصاب حوالي 25 مليون شخص في الولايات المتحدة الأمريكية .

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 لماله من دوا مهما في ترسب المعادن في النسيج العظمي bone mineralizatio (Yung *et al* .2001;Poh *et al* .2012) 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

(Meryr *et al* . 2006 ;Al-Sowyan Nada 2010) ، 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 (osteoproggestins) وال (insulin like growth) (Pennisi *et al*.,2006) وكذلك تنشيط عملية الادمصاص (Adsorption) وتثبيط امتصاص الكالسيوم من الامعاء (Abu *et al* .,2000; Boling EP.,2004) .

تشير دراسة الى ان زيادة مستوى الحامض الاميني السستسين المسماة hyperhomocystenemia له علاقة مع انخفاض كتلة العظم (low bone mass) (LBM) نتيجة لندهور بناء الياف الكولاجين collagen وكذلك الخلل الحاصل في انزيم lysyl oxidase (Meryl *et al*.,2009) بينما اشارت دراسة اخرى الى عدم وجود مثل تلك العلاقة (Brustelin *et al* ., 2010) .

ان للعوامل الوراثية دور كبير في الإصابة بمرض هشاشة (Karasik *et al.*, 2003)
ومن الجينات المرشحة والمدرسة على نحو واسع هي مستقبل فيتامين D vitamin D
receptor (VDR) ومستقبل الفا للاستروجين (ER- α) estrogen receptor alpha
وكولاجين النوع الاول collagen type I (COL 1A1), لها تأثير معنوي للمتغيرات لكل
موقع على كتلة العظم BMD. (Liu *et al.* ,2002 ;Duncan *et al.*,2003). وهناك
العديد من الطرق التي اثبتت كفاءتها في معالجة هشاشة العظام من اهم تلك الطرق هي العلاج
الهرموني (Koh *et al.* ,2006) وتناول ال bisphosphonate التي تثبط عمل الخلية
الناقضة للعظم وال aminobisphosphonate الذي ينشط بناء العظم مثل ال Fosamax
وال alendronate sodium وتناول فيتامين D وعنصر الكالسيوم او الفلورايد .
كما اشارت احدى الدراسات الى ان استخدام الشاي الاخضر كعلاج لمرض هشاشة
العظام المستحث تجريبيا في الفئران المزال لدهن المبايض جراحيا
(Yung & Samuel,2001) وفي دراسة اخرى استخلصت عشبة مائية وهي Cistanches
Herba Aqueous Extract و درس تأثيرها على تدهور كتلة العظم bone loss في
الفئران مزاله المبايض جراحيا (Haidong *et al.*,2011) .
يعتبر الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) من المركبات النباتية الطبيعية الذي
يتميز بفعالية estrogenic and/or anti estrogenic ,و الذي يعتبر احد المركبات
الفينولية متغايرة الحلقات التي تحمل تركيب مشابه للستيرويد الأستروجيني estrogenic
steroid 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
(Walker *et al.*,2001 Poh *et al.* 2012). 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 (Tang *et al.*, 2005; Vanned *et al.*,2008).

ونظرا لاهمية هشاشة العظام ولزيادة نسب الاصابة به لاسباب متعددة من اهمها سن الياس ولكثرة تعاطي العلاجات الهرمونية وما لهذه العلاجات تاثيرات جانبية خطيرة على الصحة استهدفت الدراسة معرفة تأثير الجرعة المؤثرة الوسطى للاستروجين النباتي المستخلص من الفاصوليا في الفاعلية الحيوية للخلايا بانية العظم من خلال الجينات المسؤولة لمعالجة هشاشة العظام

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

استعراض المراجع Literature Review

1-2 الفاصوليا البيضاء White bean

الفاصوليا البيضاء هي الاسم الشائع لبذور نبات كبير متنوع الاجناس من فصيلة البقوليات -فصيلة القرنيات (Leguminosae) ولها شكل كلوي ومنها البيضاء والحمراء والسوداء وغيرها وكلها تنتمي لنوعية نباتية واحدة والاسم العلمي لها (Phaseolus Vulgaris) وتشير مصادر التغذية ان البيرو في امريكا الجنوبية هي الموطن الاصلي للفاصولياء عموما ومنها" هنالك فرق بين الفاصوليا واللوبياء فهما نوعان مختلفان من النباتات وتجتمع كل من الفاصوليا واللوبياء واليزاليا والعدس والترمس والفول كلها من فصيلة واحدة القرنيات Fabaceae التابعة لصنف ثنائية الفلقة Dicotyledons وتنتمي اللوبيا لجنس Vigna بينما تنتمي الفاصوليا الى جنس Phaseolus (United Nations ,FAO. 1994).

وللفاصوليا فوائد علاجية كبيرة حيث تساعد على تنشيط ضربات القلب وتستهمل 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 (Danil and Marria 2000; Laura ,N. 2006).

2-2 الاستروجين النباتي Phytoestrogen

الاستروجين النباتي هو عبارة عن مجموعة مواد نباتية فعالة بيولوجيا مع تركيب كيميائي مشابه للاسترويدات الحيوانية Estradiol وله القدرة على الارتباط مع مستقبل الاستروجين في مختلف الخلايا (Kuiper ,1998; FAD .1999).

تعمل الاستروجينات النباتية كعمل الهرمون الانثوي وهي مجموعة متنوعة وطبيعية تظهر تراكيب تشابه الاستراديول ($17\text{-}\beta\text{- estradiol}$) لذلك تسبب التأثير الاستروجيني (Mascie and Gllian 2000;yildiz ,2005).

ان كثيرا من الاطعمة معروفة باحتوائها على الاستروجين النباتي Phytoestrogen منها فول الصويا ومنتجات الصويا وبذور السمسم والقمح و البطاطا و الفاصوليا وغيرها (Chadwik et al. ,2004).

يرتبط الاستروجين النباتي بمستقبلات الاستروجين نوع الفا في خلايا الناقضة والبانية للعظم حيث يعمل الاستروجين النباتي على الارتباط بمستقبلات الاستروجين (Estrogen Receptor (ER)) فقد سجل كل من (Oursler *et al.*, 1993; Hoyland *et al.*, 1997) وجود فعالية لهذه المستقبلات من خلال دراستهم بالزراعة النسيجية للخلايا المختبرية لعظام الجرذان . واكتشف (Mosselman *et al.*, 1996) مستقبل جديد للاستروجين وهو بيتا ER- β وينشط الجين المسؤول عن هذا المستقبل في الزعترية Thymus , الطحال Spleen , المبيض Ovary الخصى Testis , وكذلك في الخلايا البانية للعظم Osteoblast . وبينت عدة ابحاث (Onoe *et al.*, 1997 ; Arts *et al.*, 1997; Gibbs, 2000) وانه من خلال دراسة عن طريق الزراعة النسيجية لمقاطع من عظام الجرذان وكذلك من عظام الانسان لوحظ زيادة في مستقبلات نوع بيتا للاستروجين ER- β وأيضا ازدياد تمايز خلايا بانية العظم Osteoblast وان الفة الاستروجين لمستقبلات بيتا ER- β يكون اكثر من الفته لمستقبلات الفا ER- α .

ان العلاج البديل بالاستروجين الصناعي يكون ذا تأثيرات جانبية ضارة كثيرة ويسبب مشاكل كبيرة وامراض متعددة حيث يزيد من سرطان الرحم وسرطان الثدي (Hammond, 1994 ; Messina *et al.*, 1997; Turner and Glass, 2007) ،بينما للاستروجين النباتي فوائد متعددة اذ اوضحت الدراسات (Ingram *et al.*, 1997; Lethaby *et al.*, 2007) فائدته للتخفيف من الاعراض المتلازمة لسن الياس ومن اهمها الهبات الساخنة (Hot Flashes) ، للاستروجين النباتي فوائد اخرى فضلا عن اهميته في بناء العظم اذ يعتبر الاستروجين النباتي من مضادات الاكسدة Antioxidant وتشير الدراسات للتأثير الوقائي للاستروجين النباتي في التقليل من وفيات الاصابة بسرطان الثدي (Delemos, 2001; Messina *et al.*, 2008; Shuxo *et al.*, 2009) والدور الوقائي ضد امراض القلب الوعائية Cardiovascular diseases (Aldercreut, 2002) وامراض النسيج العصبي (Zhao and Mu, 2011) والدور الوقائي لمرض هشاشة العظام (Pie *et al.*, 2000 ; Yildiz, 2005) Osteoporosis .

كما سجلت الابحاث فائدة العلاج بالاستروجين النباتي الذي يحسن وظائف الذاكرة ووظائف الدماغ في الجرذان مزالة المبايض (Gibbs,2000) وكذلك تأثيره في علاج اضطرابات سن اليأس عند النساء (Resncik *et al.*, 1997).

ان العلاج البديل في سن الياس والذي يكون صناعيا له اثار جانبية متعددة اذ يزيد من خطر تطور سرطان الرحم وسرطان الثدي (Gibbs, 2000)، وكذلك تأثيره على الرحم اذ يزداد وزن الرحم مقارنة بمجموعة السيطرة حسب دراسة اجريت على الجرذان مزالة المبايض (Pandeny *et al.*, 2010) وايضا تأثيره ودورة الوقائي ضد مرض السكري وكذلك السمنة في الحيوانات والانسان

(Ranich *et al.*, 2001; Velasquez and Bhathena, 2001).

ان عمل الاستروجين النباتي بالجسم يتأثر بعوامل منها الفترة الزمنية للعلاج فيجب ان يؤخذ قبل البدء بسن الياس والحالة الهرمونية في النساء (Clarkson, 2000; Patisaulh, 2005). ويكون الاستروجين النباتي بشكلين كيميائيين بالغذاء: الاول Glycones الشكل غير المرتبط بجزيئة السكر والثاني Glycosid المرتبط بجزيئة السكر والمصدر الغذائي الرئيس هو Glucosid والذي يكون فعال بايولوجيا (Rowland *et al.*, 2003; Atkinson *et al.*, 2005)

3-2 خلايا العظم Bone Cells

العظم هو احد الانسجة الرابطة (connective tissues) وان عملية اعاده بناء وترميم العظم تعتبر جحالة صحية للعظم والتي بإمكانها اصلاح الاجزاء الدقيقة المحيطة من العظم وابدالها بخلايا جديدة ، وان هذه العملية الخلوية تتضمن فعاليات مختلفة لخلايا ناقضة للعظم Osteoclast (bone resorbing cells) والخلايا البانية للعظم Osteoblast والتي تكون وحدة العظم متعددة الخلايا bone multicellular unit (Hofbauer *et al.*, 2000).

ان خلايا ناقضة العظم وهي خلايا متعددة الانوية مشتقة من الخلايا الجذعية hematopoitic stem cells والتي تكون داخل حفر وتجاويف على السطح الداخلي للعظم ويكون الغلاف البلازمي متكون من منطقتين هما الطبقة الواضحة والطبقة المثيجة Clear Zone, Ruffled border` (Suda *et al.*, 1992). يعتمد نشاط الخلية الناقضة للعظم osteoclast على تحرير مادة Tartrate –Resistant acid phosphate (TRAP) للعظم Matrix وتنتج الانزيمات (Dolores, 2010).

توجد كثير من العوامل الوراثية التي تنظم كتلة العظم وتتضمن جينات مستقبل البروتينات الدهنية واطئة الكثافة -Low-density Lipoprotein Receptor-Selerotin(SOST), Osteoprotegrin (OPG),related Protein5 (LRP5) ومستقبل الاستروجين ومنشط مستقبل الاستروجين-1 and receptor activator of NF-KB(RANK) (Ralston,2010).

ومن اهم العوامل الوراثة التي تتوسط فعالية ونشاط خلية ناقضة العظم هي estrogen Osteoprotegrin(OPG),receptor activator of NF –KB (RANKL) المرتبط بينما يكون (LRP5) واحد من اهم واغلب العوامل التي تتوسط نشاط خلية بانية العظم Osteoblast (Glass *et al.* ,2005;Robling *et al.* ,2008).

يحفز عملية ادمصاص العظم من خلال انتاج RANKL بواسطة الخط الخلوي لبانية العظم وان ارتباط RANKL الى مستقبله RANK ينشط من انتاج معقد المسار الخلوي المتضمن عامل NF-KB والذي يحث انتاج جينات الخلايا الناقضة العظم (Robling *et al.* ,2008) وان OPG يمنع ارتباط RANKL الى RANK وهناك بروتينات تسمى (wnts) تنشط مسار ال (LRP5) الذي يحفز تكوين العظم ويثبط ادمصاص العظم وهناك مختلف المثبطات لإشارات (LRP5) التي شخّصت متضمنة (SOST) Sclerortin الذي ينتج من قبل الخلايا العظمية osteocyte ويكون عمله كوسيط للتأثير الميكانيكي في الهيكل العظمي (Keams *et al.* ,2008).

نسبة OPG الى RANKL تكون عامل كمفتاح في تنظيم تحويل العظم الطبيعي normal bone turnover وكتلة العظم الى المرونة فتكون عدد من الهرمونات وعوامل النمو (TGF-B , BMP2 , IGF-1 , السايبتوكينات) (1L-6 , 1L-1 , TNFa , prostaglandins E2) والادوية تحت التعبير الجيني (OPG/RANKL) وكذلك تحول العظم Bone Turnover (Khosla *et al.* ,1994);). كذلك فان عدم التوازن في اعادة بناء وترميم العظم bone remodeling في سن الياس هو حاصل في نقص الاستروجين (Cumming *et al.* ,1998)، وينخفض مستوى هرمون التستستيرون testosterone في مصل الدم للرجال وبتقدم العمر مما يؤدي الى فقدان في كتلة العظم (Greendale *et al.* ,1997).

من الخلايا الاخرى للعظم هي بانية للعظم Osteoblast وهي المسؤولة عن انتاج المادة الاساس للعظم matrix وان هذه الخلايا تقع على السطح الخارجي للعظم وتكون متميزة ومكعبة الشكل

وهي تفرز بروتينات كولاجينية مثل الكولاجين نوع I Collagen type I وكذلك تفرز بروتينات غير كولاجينية (Sandbery,1991;Mastuo and Ine,2008). وتكون الخلايا بانية العظم الناضجة هي المسؤولة عن افراز العديد من العوامل منها (Collagenase , Fibronectin , Osteocalcin , Alkaline Phosphate (ALP))، ووجود هذه العوامل خصوصا (Osteocalcin , ALP) في مصل الدم تعتبر كدلالات قياسية لتكوين العظم (Bianco *et al.* ,1993).

ان الخلايا البانية العظم Osteoblast تفرز المادة بين الخلوية التي تعطي صلابة للمادة الاساس حيث تزيد من كثافة العظم للمعادن وعندها تدعى المادة الاساس Osteoid اي شديدة الصلابة في محتواها من المعادن وهناك الكثير من المستقبلات منها الهرمونات والساييتوكينات خلوية بانية العظم،و للخلايا البانية للعظم القدرة على السيطرة لتنظيم لخلايا ناقضة العظم osteoclast بواسطة افراز عامل محفز M- macrophage-colony stimulating factor (CSF) وكذلك المستقبل RANK والمرتبطة RANKL (Boyze and Xing,2008 ; Dolores,2010) وان خلايا بانية العظم تملك مستويات عالية للارتباط بانزيم ALP حول الغشاء والتي تلعب دور مهم في زيادة المعادن للعظم (Rodan and Nada,1991).

وخلايا Osteocytes هي ثالث انواع الخلايا للعظم وهي عبارة عن خلايا بانية العظم Osteoblast ولكنها تعتبر الناضجة والتي تكون محصورة داخل فجوات Lacunae وتكون 90% من خلايا العظم ولها امتدادات طويلة في جسم الخلية Canaliculi ممتدة داخل المادة الاساس وترتبط خلية باخرى وان وظيفة خلايا Osteocyte بناء بعض بروتينات المادة الاساس لصلابة كتلة العظم (Buch *et al.* ,1996;Kenny and Raise ,2002).

1-3-2 بروتين كولاجين نوع (Collagen type I)

ان مرونة العظم لاتعتمد فقط على كمية العظم وانما على نوعية الانسجة التي يحتويها والتي تميز الشكل الهندسي المرتب للعظم كذلك على كمية المعادن وايضا على كمية الكولاجين (Ricard and Ruggiero ,2005).

تحتوي المادة الاساسية للعظم Matrix على بروتينات الكولاجين وخصوصا الكولاجين نوع I الذي يعرف ايضا (Col . 1A1) ، الكولاجين هو البروتين الذي يعطي الدعم والمرونة للعديد من الانسجة بالجسم وهي الغضاريف Cartilages ، الاربطة Tendon ، الجلد (Geigor *et al.* ,2001).

ان مرض هشاشة العظام وشفاء الكسور وكذلك زراعة العظام تعتمد على كمية المعادن للعظم والقابلية على انتاج المادة الاساس للعظم التي تتكون بصورة رئيسة من الكولاجين نوع I. ان انتاج الكولاجين يتراجع اثناء ادمصاص العظم الذي يؤدي الى تحرر بروتينات غير كولاغينية وعوامل نمو اخرى ممكن ان تستعمل في تشخيص مختلف امراض العظام وان لبيفات الكولاجين هي التي تنظم وترسب تجمع المعادن في المادة الاساس للعظم (Murshed *et al.* ,2005;Birk and Brukner ,2011).

2-3-2 الفايبرونكتين Fibronectin

هو بروتين يتكون من سلسلتين متعددة الببتيد مرتبطة بزواج من الاواصر S – له اهمية في ترابط الخلايا وفي النمو وتمايز الخلايا (Maoy ,2005) . ويكون الفايبرونكتين في المادة البينية حيث يدعم الاعضاء والانسجة (Pankor and Yamada , 2002) وهو يحفز الهرمونات التناسلية في الفقريات ويكون قادر على السيطرة على الجينات المتعلقة بها ويكون الفايبرونكتين مهم جدا في تنظيم بروتينات للغشاء البلازمي فهو مهم لتنظيم الخلايا البانية للعظم اثناء تكون العظم (Parsons *et al* ,2010 ; Kim *et al* ,2011) ان بروتينات المادة الاساس مثل الفايبرونكتين تسهم في بقاء وديمومة خلايا بانية العظم (Denthart *et al* ,2001;Gerhammar *et al* ,2011).

2-4 الهرمونات والمنظمات الأخرى للعظم :

يمثل العظم المستودع الرئيس للكالسيوم في الجسم حيث يحتوي على 99% من كالسيوم الجسم وان الكالسيوم مع فيتامين D تكون من العوامل الأولى والمهمة في الحفاظ على كتلة العظم . (Grant *et al* ,2005) .

ان النساء اللواتي يتناولن المركب المعقد المتكون من الكالسيوم والمغنيسيوم والزنك وفيتامين D وفيتامين K في سن الياس يكون قلة كثافة العظم من المعادن لديهن اقل من اللواتي لم تجهز بالمعقد ..(Braam *et al* ,2003) .

2-4-1 هرمونات الغدة جار الدرقية Parathyroid gland hormone (PTH)

من اهم الهرمونات التي تنظم توازن الكالسيوم وايض العظم هي هرمونات الغدة جار الدرقية Parathyroid gland hormone (PTH) , فيتامين D , والكالسيتونين Calcitonin .(Grant *et al* ,2005) .

ان انخفاض الكالسيوم Hypocalacemia بسبب زيادة افراز هرمونات (PTH) التي تؤدي الى زيادة امتصاص الكالسيوم بالقناة الهضمية واعاده امتصاصه في الكلى والعظم .وان هرمونات الغدة جار الدرقية ترتبط الى مستقبل في خلايا بانية العظم وكذلك خلايا ناقضة العظم حيث ان تأثيرها يكون محفز للتكاثر وفعالية خلايا الناقضة Osteoclast مما يعزز في ادمصاص العظم (Agar and Gay ,1992;Hock and Gere ,1992) bone adsorping حيث يسهم تأثيرها على خلايا بانية العظم Osteoblast الى تثبيط بناء الكولاجين نوع I Collagen type I وتختزل فعالية انزيم ALP وتنشط قنوات الكالسيوم (Fritsch *et al* ,1994) .

فقد وجد ان المعالجة بهرمونات PTH لاناث الارانب المستحث فيها هشاشة العظام عن طريق ازالة مبايضها واعطائها جرع من القشريات الكلوكورتنيزية glucocorticoids ان كثافة العظم من المعادن Bone mineral density BMD وتركيز معادن العظم Bone mineral concentration(BMC) اكثر من الجرعة غير المعالجة(Bellido *et al* . , 2010) .

ان هرمون T3 يزيد من تكاثر وتمايز الخلايا بانية العظم Osteoblast في جسم الانسان (Kassem *et al*.,1993) ولكنه من ناحية اخرى يزيد من تدهور الكولاجين ومن ثم يزداد ادمصاص العظم resorption of bone (Allian *et al*.,1992) .

2-4-2- فيتامين D

فيتامين D هو المنظم الرئيس لمستوى الكالسيوم في الجسم فهو يؤثر على امتصاص الكالسيوم في الامعاء absorption واعداد امتصاصه في الكلى reabsorption وادمصاصه في العظم adsorption، ويكون التعبير الجيني والمستقبل لفيتامين D بالخلايا بانية العظم (Van et al.,2001) .

ان المصدر الرئيس لفيتامين D هو الغذاء اضافة الى عمل الاشعة فوق البنفسجية على الجلد فيتحول الى D3 ويكون بصورة 25-(OH)-VitaminD3 و 24-25-(OH)₂- VitaminD3 (Henry,1992).

3-4-2 الكالسيونين Calcitonin

تفرز الغدة الدرقية هرمون الكالسيونين استجابة الى مستوى الكالسيوم في الجسم وذلك بحالة زيادة الكالسيوم في مصل الدم Hypercalcemia فتتخفص نسبته في الدم فهو يثبط ادمصاص العظم resorption حيث يثبط هرمون الكالسيونين حركة وتمايز خلايا ناقضة العظم ويتسبب بقلة نشاطها وقد وجد في الابحاث ان المعالجة بهذا الهرمون تثبط ادمصاص العظم ومن ثم يقل النقص الحاصل لكتلة العظم . (Alam et al ,1993;Zaidi et al , 1994).

4-4-2 هرمونات القند Gonadotropic hormones (FSH,LH)

ان هرمونات القند أو ماتسمى (بموجه الغدد التناسلية) ومجموعة الهرمونات الستيرويدية(الاستروجين والبروجيسترون وغيرها) هي المنظمة للدورة التكاثرية للنساء, وتشتمل الهرمونات الموجه للغدد التناسلية على هرمون محفز الجريبات Luteinizing Follicle- stimulating hormones (FSH) وهرمون اللوتيني Pituitary gland (LH) hormone , والذان ينتجان من قبل الغدة النخامية (ويطلق أو يفرز في مجرى الدم , إما الهرمونات الستيرويدية التكاثرية فتنتج وبشكل كبير في المبيض خلال الدورة الحيضية التي تتكرر كل 28 يوم ,حيث يفرز كلاً من الهرمون اللوتيني وهرمون المحفز للجريبات من الفص الأمامي من الغدة النخامية وبنفس النمط , يحفز هرمون محفز الجريبات على إفراز الهرمون المثبط Inhibin والذي بدوره يتحكم بإفراز الهرمون المحفز للجريبات عن طريق آلية التغذية الراجعة Feed back mechanism و يحفز الهرمون اللوتيني على إنتاج

الهرمونات الستيرويدية (هرمون الاستراديول Estradiol) وكما إن الهرمون اللوتيني يكون مسؤول عن إرسال الإيعاز إلى المبايض لإفراز هرمونات أخرى مثل هرمون البروجيسترون الذي يجهز بطانة الرحم لاستقبال وتغذية الجنين (الجميل, 2002), ويكون الهرمون اللوتيني في منتصف الدورة الحيضية مسؤولاً عن الإباضة وكما إن إفرازه بشكل مستمر يحفز الجسم الأصفر Corpus luteum لإنتاج البروجيسترون, كما إن نمو وتطور الجريبات المبيضية يقع تحت تأثير الهرمون المحفز للجريبات بصورة كبيرة, أما إنتاج الاستروجين من هذه الجريبات فيعتمد على كلاً من الهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني (العلوي, 2005), وان معدلات الإفراز لهرموني FSH و LH يكونان عاليين خلال المرحلة الجريبية من خلال مرحلة الجسم الأصفر في دورة التبويض (Humaidan, 2004).

2-4-4-1 هرمون الاستروجين

لهرمون الاستروجين تأثيرات كبيرة على توازن الكالسيوم للعظام واثبتت الابحاث ان نقص هرمون الاستروجين في النساء بسن الياس هو أحد أسباب الإصابة بمرض هشاشة العظام (Ganice, 2011), (Gortora et al, 2010), و (Keting et al., 1991). يكون التركيب البنائي لهرمون الاستروجين بثلاث صور: الشكل الاول (E1) Estrone ويشكل 10-30%, الشكل الثالث (E3) Estriol ويشكل 60-80%, ويعتبر الشكل الثاني (E2) Estradiol هو الاستروجين النشط الرئيسي, ويكون المبيض المسؤول عن إفراز كلاً من E1, E2 بينما ينتج E3 من هدم كلاً من E1, E2 في النساء غير الحوامل ويوجد بتركيز عالي في الإدرار أثناء فترة الحمل (Britt & Findlay, 2002).

يصنع هرمون الاستروجين في كل الفقريات (Vertebrates), وفي بعض الحشرات (Insects) (Mechoulam et al., 2005) وهذا دليل على إن لهذا الهرمون تاريخ تطوري قديم, مثل كل الهرمونات الستيرويدية (Steriod hormones). ينتشر هرمون الاستروجين بسهولة عبر غشاء الخلية إلى داخلها الخلية حيث يرتبط ويتفاعل مع مستقبل هرمون الاستروجين الذي بدوره يعدل التعبير الجيني للعديد من الجينات (Whitehead & Nussey, 2001), ورغم كون الاستراديول (E3) هو الأكثر وفرة من هرمون الاستروجين ولكنه الأضعف, في حين أن الاستراديول (E2) هو الأنشط بحوالي 80 x من

الاسترايول (E3) ومن ثم هو هرمون الاستروجين (الاستراديول) والأكثر أهمية في الإناث غير الحوامل من مراحل بدء الحيض Menarche حتى مرحلة انقطاع الطمث (سن اليأس) خلال الحياة .

في سن اليأس Postmenopausal يصبح ايسترون Estrone هو الشكل الأساسي لهرمون الاستروجين في الجسم , ويتم إنتاج نوع آخر من هرمون الاستروجين يدعى استيترول Estetrol (E4) والذي ينتج خلال فترة الحمل فقط ويصنع جميع أشكال هرمون الاستروجين المختلفة من الاندروجينات Androgens الاندروستيديون Androstenedione بوجود إنزيم الاروماتيز Enzyme aromatase (Fang *et al.*, 2001) .

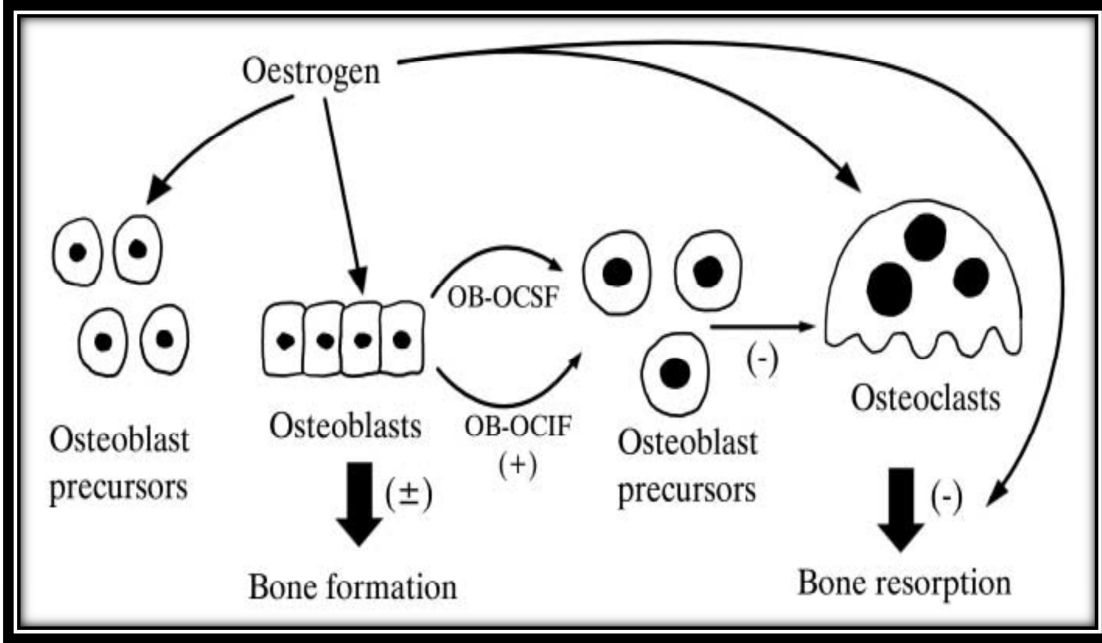
ويعد المبيض الموقع الرئيس لإنتاج الاستروجين في الأنثى غير الحامل , كما يلاحظ أن المصدر الرئيس لتصنيع الهرمونات الجنسية الثانوية يتمثل في تحويل الخلايا إلى كولستيرول ثم إلى اندروستيديون ليتحول إلى تيستوستيرون وبالتالي يتحول إلى استيرون واستيرادول , كما توجد الاستروجينات في بلازما الدم بصورة حرة أو مرتبطة مع بروتينات البلازما (Meyer *et al.* , 2006); (العلوي , 1989) .

ان الاستروجين هو مثبت لادمصاص العظم حيث انه يقلل من عدد وفعالية خلايا ناقضة العظم وهو يسرع من عملية الموت المبرمج لخلايا ناقضة العظم (Kong *et al.*, 1999) . ان المعالجة بالاستروجين تثبط عمل الخلايا ناقضة العظم osteoclast حيث يتسبب فعل الهرمون بخسارة التصاق خلايا ناقضة العظم على سطح العظم ويكون عمل الاستروجين ايجابي على خلايا بانية العظم osteoblast حيث ينشط تكوينها مما يدعم بناء العظم (Liu and Howard, 1991) bone formation .

ان ارتباط مختلف السايوكينات الى مستقبلاتها في خلية بانية العظم يحفز إنتاج العوامل الذائبة التي تعمل مباشرة على خلايا ناقضة العظم حيث تتوسط فعاليتها وتنشط عملها (Turner *et al.*, 1994) .

ومن هذه السايوكينات التي تزيد من فعالية خلايا ناقضة العظم هي (Macrophage- Colony Stimulating), Colony Stimulating Factor GM-CSF)) (Interleukin-1, IL-1), (Tumor Necrosis Factor α –TNF- α), (Factor M-CSF Thomson ; Ishimi *et al.*, 1990; Corbzo *et al.*, 1992) . (IL-6) Interleukin -6) و (et al., 1987) .

يثبط هرمون الاستروجين يثبط ظهور العوامل المحفزة لخلايا osteoclast او يعزز ظهور العوامل التي تثبط خلايا osteoclast (Turner ,1991) كما موضح بصورة رقم (2-1)



صورة 2- توضح تأثير الاستروجين على خلايا العظم (Krassas and Papadopoulou,2001).

5-2 هشاشة العظام Osteoporosis

يعد هشاشة العظام مشكلة نامية وخطيرة في العالم الغربي والعربي اذ يعاني حوالي 25 مليون شخص في الولايات المتحدة من الاصابة بهشاشة العظام (Meryle *et al.*, 2009) وتقريبا 32% من الرجال و 44% من النساء يعانون من المرض سنويا من هذا المرض في المملكة العربية السعودية (Pah *et al.*, 2011).

سجلت المنظمة العالمية لهشاشة العظام حوالي اكثر من 17 دولة في افريقيا والشرق الاوسط تعاني من الاصابة بهذا المرض ولكن المعلومات غير دقيقة وكافية ذلك لاهتمام الحكومات المحلية والمنظمات الصحية مثل منظمة الصحة العالمية (WHO) ببقية الامراض وخصوصا الوبائية منها مثل السل الرئوي والمنتشرة مثل مرض سكر الدم وامراض القلب الوعائية وعليه يجب الاهتمام لهذا المرض الصامت بسبب زيادة نسبة الوفيات Mortality به كل عام (Ola ,2011;International Osteoporosis Foundation (IOF), 2011).

ان المشكلة الرئيسية للسيطرة على مرض هشاشة العظام هي في حالة الكسور الكبيرة التي تحدث وتشخص وتعالج في وقت مبكر ويجب متابعتها باستمرار كي لا يتفاقم الامر للوصول للمرض هشاشة العظام بالرغم من توفر العلاجات والمعدات والوسائل الامنة للتشخيص وعلاج الكسور (Eisman *et al*, 2004).

وينتشر مرض هشاشة العظام بصورة سريعة في كافة المناطق حيث تكون الكلفة لعلاجها باهظة الثمن جدا مقارنة ببقية الامراض فهو مرض غير مسيطر عليه وهذه احدى المشاكل الرئيسية لانتشار المرض (Siris *et al*, 2004). تتضمن العلاجات المستخدمة لهشاشة العظام العلاجات الكيميائية المعتمدة على العقاقير والادوية مثل ادوية bisphosphonates والتي تتضمن (zoledronate, risedronate, alendronate) والاستروجين وقد بينت فائدة العلاج الهرموني البديل (Hormone replacement therapy (HRT)) لمنع الكسور وكذلك فائدتها في علاج سرطان القولون ولكن لهذا العلاج البديل الكثير من عوامل خطر التي تصيب المرأة لدى استخدامها لمثل هذه العلاجات البديلة مثل الاصابة بسرطان الثدي وامراض القلب الوعائية (Rossouw *et al*, 2002; Heaney *et al*, 2003; Maclean *et al*, 2008). وقد استخدم الباحثون علاجات مختلفة تعالج المرض او تقلل من حدته مثل العلاجات المستخلصة من النباتات المختلفة وكذلك قسم منهم استعمل التمارين الرياضية كالمشي وغيرها التي تساعد في قوة العظم وصلابته وكذلك التوازن في الغذاء الذي يحوي على الكالسيوم وفيتامين D (Gregg *et al*, 1998; Bonaiut *et al*, 2009).

هشاشة العظام هو من اكثر امراض العظام الايضية شيوعا وان اغلب الانواع انتشارا لهشاشة العظام هو النوع المتعلق بالنقص الحاصل في هرمونات المبايض في حالة سن الياس Menopause او ازالة المبايض جراحيا Overiectomized (Hidaka *et al*, 2006; Potu *et al*, 2009) ويتميز مرض هشاشة العظام بقلة كتلة العظم وتدهور في النسيج العظمي مما تؤدي الى زيادة في كسر العظم نتيجة انخفاض كثافة المعادن للعظم (Bone Mineral density (BMD) وقلة محتوى العظم من المعادن (bone mineral content (BMC) (Zehnder, *et al*, 2004) و(Maimoun, *et al*, 2002).

ان تنظيم توازن العظم يعتمد على اعادة بناء وترميمه Bone Remolding الذي يكون عن طريق تبديل الخلايا القديمة والمتحطمة بخلايا عظمية جديدة لتنظيم مرونة ومطاطية العظم (Manolagas, 2000)، وان عدم التوازن بين اعادة بناء العظم وادمصاص العظم يقود الى

مرض هشاشة العظام الذي يكون فيه ادمصاص العظم Resorption of bone بصورة اكبر من تكوينه اثناء اعادة بناء وترميم العظم (Parfitt, 1994).

ان من العوامل التي تساعد على الاصابة بمرض هشاشة العظام منها التقدم بالعمر و قلة تعاطي الكالسيوم والعلاجات المستعملة لكبح حموضة المعدة (Taal et al, 1999) فقدان المناسل لوظائفها وبالتالي قلة في افراز الاستروجين وكذلك قلة في النشاط الرياضي، التدخين، الاستخدام المفرط لادوية القشرانيات الكلوکورتيزية glucocorticoid وايضا بعض العوامل الوراثية (Stehman et al, 2000; Brandenburg et al, 2002). ان مرض هشاشة العظام يكون على نوعين الاولي او البدائي primary osteoporosis و الثانوي secondary osteoporosis حيث يكون مرض هشاشة العظام الثانوي متعلق بامراض اخرى مثل امراض الكلى , واضطرابات الغدة الصماء , مرض التهاب المفاصل , وامراض الجهاز الهضمي (Gones et al, 1994; Cooper and Melton, 1996; Epstein, 2000).

مرض هشاشة العظام الاولي او البدائي هو الاكثر شيوعا وهو يتضمن انخفاض في كتلة العظم الناتج من التقدم في العمر كما في سن الياس او ازالة المبايض جراحيا حيث يقل و يختفي هرمون الاستروجين وان في هذا النوع يلاحظ انخفاض في كتلة العظم مع تدهور الانسجة ووجود الترتيب الهندسي غير المنظم ويكون نسيج العظم حاوي على تجاوزيف كثيرة ويصبح العظم هش وغير متين حيث يكون عرضة للكسر وان اكثر المناطق تعرضا هي الفقرات , عظم الورك, عظم الفخذ, (Melton, et al, 1992; Akhter, et al, 2000).

6-2 عمليات إزالة المبايض Ovaryectomy

ان معدل عمليات ازالة المبايض الجراحية في الولايات المتحدة الأمريكية تقدر بمعدل 55% من جميع النساء اضافة الى عمليات استئصال الرحم Hysterectomy بحوالي 300.000 . (Parker,2010)

أن 90 % من الاورام هي استئصال الأورام الحميدة حيث كان هناك اتجاه متزايد في استئصال التهاب البوق الرحمي والمبيض (SO) Salpingo –oophorectomy من 25 % في عام 1965 إلى 55 % في عام 1999 , 38 % تتم قبل عمر 45 عام , ونسبة 78 % ما بين 45-65 عام (Parker et al ., 2009).

أن المضاعفات الملحوظة بعد إجراء عملية إزالة المبايض هي ازدياد في أمراض الجهاز الوعائي Cardiovascular disease والتأثير السلبي للدهون البروتينية و علامات التجلط الدموي Clotting parameters وازدياد علامات هشاشة العظام وكثرة حدوث حوادث كسور الورك Hip fracture وتراجع في الذاكرة , وتجري عمليات إزالة المبايض لأسباب متعددة قد تكون بسبب أمراض سرطانات المبيض Ovarian cancer (Schwatz , 1992) أو أمراض سرطان الثدي Breast cancer (Parker et al ., 2009) , أو بسبب وجود كيس على المبيض Ovarian cyst أو بسبب أمراض متلازمة المبيض Ovarian remnant syndrome (Parker et al ., 2009) . إن حوالي 20 % من النساء اللواتي تعرضن لانقطاع الطمث الجراحي تظهر عليهن أعراض ارتفاع ضغط الدم Hypertension وتصلب الشرايين Atherosclerosis , ولوحظ بان اللواتي تعرضن لأجراء عملية إزالة المبايض الثنائية قبل سن 45 عام مرتبط مع ارتفاع معدلات الوفيات بسبب أمراض القلب الوعائية (Rivera et al ., 2009) .

وتؤدي عملية استئصال المبايض إلى نقص مستوى تركيز هرمون الاستروجين Hypoestrogen وفقدان الدورة الحيضية وتزداد مستويات هرمونات مغذيات المناسل Pituitary gonadotropins في الدم نتيجة لفقدان آلية التغذية الاسترجاعية السالبة (Guyton , 2006) Negative feed back mechanism .

كما استئصال المبايض يؤدي إلى فرط نمو النسيج الدهني وزيادة في عامل نمو البشرة (EGF) Epidermal growth factor وقد لوحظ ان هذه العوامل لها تأثير مهم في حدوث السمنة في الجرذان مستأصلة المبايض (Kurachi *et al* ., 1993) , لذا فان عملية استئصال المبايض تكون مشابه لسن اليأس عند النساء وتمثل الفترة التي تتوقف فيها الدورات الحيضية والتغيرات الرحمية بعمر ما يقارب 45-55 سنة وعند هذه الفترة لاتستجيب المبايض لهرمونات الكوندوتروبينات المفرزة من الغدة النخامية ويقل إفراز هرموني الاستروجين والبروجيسترون , وتزداد نسبة الإصابة بأمراض الشريان التاجي والأوعية الدموية نتيجة لانخفاض مستوى هرمون الاستروجين بشكل خاص وبما إن هرمون الاستروجين المعروف بخصائصه المضادة للأكسدة لذا فان عملية استئصال المبايض تؤدي إلى زيادة الكرب التاكسدي (Bray *et al* , 1999) .

7-2 سن اليأس Menopause

يعرف مصطلح سن اليأس Menopause بأنه مرحلة انقطاع الطمث عند النساء , وتعني بفترة الحيض النهائية للمرأة , والانحسار الكبير للهرمونات الستيرويدية الإنجابية Steroid reproductive hormones وهي علامة لنهاية الخصوبة عند المرأة , وان سن اليأس أو انقطاع الطمث الطبيعي هو نتيجة لقلّة إنتاج هرمون الاستروجين والبروجيسترون من المبيض, حيث أن هذه الهرمونات تنظم الدورة الحيضية لدى المرأة Menstruation . تعتبر مرحلة فترة سن اليأس أو انقطاع الطمث هي المرحلة الأكثر ضعفاً وتأثيراً على الصحة (Hickey *et al* ., 2005) .

أن سن اليأس هي التغيرات الطبيعية لدى المرأة والتي تكون من الفترة ما بين حوالي من 45-55 سنة. (Ginsburg *et al* ., 1996) , لذا فان سن اليأس هي شيخوخة طبيعية وهي مرحلة عبور المرأة من مرحلة الإنجاب إلى مرحلة عدم الإنجاب , وهذه المرحلة أيضاً لها أعراضها مثل هبات الحرارة Hot flashes التي تعترى المرأة خلال هذه المرحلة والتي يعتقد بأنها حالة (صرع حركي وعائي) Vasomotor episodes والتعرق البارد (Nelson , 2008) .

بالإضافة إلى حالات الأمراض الوظيفية Pathophysiologic conditions مثل فقدان كثافة المعادن في العظم وضعف وجفاف الجلد والتعجيل في فقدان الكولاجين في الجلد وظهور التجاعيد Wrinkling وقلة أو انعدام الرغبة الجنسية Libido وضعف اوفقدان الذاكرة وازدياد معدل أمراض الجهاز الوعائي Cardiovascular وتراجع الفكر المعرفي وارتفاع معدلات الكآبة النفسية Depression وحدوث تغيرات في المزاج Mood مثل القلق والمعاناة الكثيرة وضمور الجهاز البولي التناسلي (Shuster *et al.* , 2008) Urogenital atrophy .

الفصل الثالث
المواد وطرائق العمل

**Materials and
Methods**

Materials and Methods

1-3 العدد المستخدمة بالدراسة الجزيئية

الجدول 1-3 يمثل العدد التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة المصنعة والمنشأ

الشركة وبلد المنشأ	مكوناته	اسم العدة	ت
Bioneer-Korea	Trizol Reagent 100 ml	AccuZol™ Total RNA extraction kit	1
Biobasic-Canada	DNase I enzyme	DNase I enzyme set kit	2
	10X buffer		
	Free nuclease water		
Bioneer-Korea	-RocketScript Reverse Transcriptase (200μ)	AccuPower® RocketScript™ RT PreMix	3
	-5x Reaction Buffer (1x)		
	-DTT (0.25 Mm)		
	-dNTP (250 μM each)		
	-RNase Inhibitor (1μ)		
Bioneer-Korea	2x Greenstar Master mix	AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix	4
	-8 Well strips x 12 each		
	-DEPC-D.W. 1.8 ml x 4 tubes		

Primers 3-1-3 البادئات

البادئات التي استعملت في هذه الدراسة الجزيئية والتي صممت باستعمال التعاقب التام للجينات (Collagen- I, Fibronectin, Kappa-B) لخلايا العظم للأرنب والبادئ المنظم هو الجين المنظم β -actin في بنك جمع المعلومات للجينات من موقع NCBI Gene-Bank للبادئات وجهازت من شركة بايونير في كوريا كما بالجدول الاتي:-

Primer	Sequence		Product size
Collagen-I	F	5 ⁻ ACAAAGGTCATCCTGGTCTTGC 3 ⁻	113bp
	R	5 ⁻ CTGTTACCTTTTCCACCTTGC 3 ⁻	
Fibronectin	F	5 ⁻ TTTAAGCTCTCGTGCCAGTGC3 ⁻	88bp
	R	5 ⁻ AGTTCACACCGTTGTCATGGC3 ⁻	
Kappa-B	F	5 ⁻ TTCGTTTGATGCCAGCCCTTG3 ⁻	87bp
	R	5 ⁻ TGGCAGCTGGTTTTGCTTCTG3 ⁻	
B-actin	F	5 ⁻ ATCAAGGAGAAGCTGTGCTACG3 ⁻	125bp
	R	5 ⁻ TCGTTGCCGATGGTGATGAC3 ⁻	

F=forward

R=reverse

2-3- الحيوانات المستخدمة في التجربة Experimental animals

استخدمت في هذه الدراسة 80 من إناث الأرانب المحلية *Oryctatagus cuniculus* يتراوح معدل أوزانها ما بين (1500 - 2000) غرام وتراوحت أعمارها بين (8-9) أشهر , وضعت في أقفاص معدة لهذا الغرض حيث تم إيواء الارانب في أقفاص خاصة مغطاة بأغطية معدنية مشبكة وفرشت الاقفاص بنشارة الخشب كما تمت العناية بنظافة الاقفاص وتعقيمها بين الحين والآخر بالمطهرات في البيت الحيواني التابع لكلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء , وتم توفير الماء والغذاء بصورة حرة وجرعت علاجاً للتأكد من خلوها من الأمراض المختلفة , إذ جرعت فموياً 0.5 ملغم من (Sodium -Sulfadimidine) في 1 لتر من الماء ولمدة 5 أيام متتالية , و 0.5 ملغم من (Ampicillin 20 % W.S.P.) في 1 لتر من الماء ولمدة 5 أيام متتالية . وتركت الحيوانات مدة اسبوعين للتأقلم مع الظروف المشار اليها اعلاه قبل اجراء التجربة.

3-3- تصميم التجربة

1-3-3 التجربة الاولى experiment 1

استهدفت هذه التجربة استخلاص الاستروجين النباتي phytoestrogen من الفاصوليا البيضاء المجففة المتوفرة بالأسواق وتم الاستخلاص حسب الطريقة المتبعة من قبل

. Rober- Gayuon(1972)

كالآتي:-

طريقة العمل:-

تم عزل مركب الاستروجين النباتي phytoestrogen وفقا للطريقة المتبعة من قبل Rober-Gayuon (1972) بعد اجراء تحوير بسيط عليها وفق الخطوات التالية:-

1- الاستخلاص

أ-أخذت 50 غرام من حبوب الفاصوليا البيضاء ووضعت في دورق زجاجي سعة) 250 ml (مل واضيف اليها (200) مللتر من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2% واستعمل المكثف العاكس (Reflex condenser) لمدة ساعة.

ب- بعد انتهاء عملية الاستخلاص ترك المحلول ليبرد ورشح بورق watt Mann .no.1

ج-وضع الراشح في قمع الفصل واضيف اليه حجم مساو من الكلوروفورم حيث تكونت طبقتان عزلت الطبقة العليا وركزت بالمبخر الدوار ،جففت بعد ذلك بالفرن على درجة 40 مئوية ثم وزنت.

2- الكشف عن الفلافونات Flavonoids

وضع 1 مللتر من المستخلص النباتي في انبوبة اختبار واضيفت له قطرات من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 اذ يدل ظهور اللون البنفي المحمر على ايجابية الكشف (Cannell 1998).

3- فصل الاستروجين النباتي phytoestrogen

استخدمت تقنية (Thin layer chromatography(TLC) في تنقية وفصل الاستروجين النباتي وفقا للخطوات التالية:

أ-اضيف 5مللتر من البروبانول Propanol الطبيعي الى عينة الفاصوليا المستخلصة.

ب- تم تنشيط الواح TLC بوضعها في فرن كهربائي بدرجة حرارة 105 درجة مئوية لمدة ساعة

ج-وضع 15 مايكروليتر من محلول الهرمون القياسي للاستروجين النباتي بواسطة انبوبة شعرية على لوحة TLC وعلى الجهة اليسرى منها وبمسافة 2 سم من الحافة السفلية للوحة بعدها وضعت عينة (15)مايكروليتر من مستخلص الفاصوليا على اللوحة وعلى بعد 2 سم من بقعة المحلول القياسي وكررت هذه العملية اربع مرات على كل لوحة .

د- وضعت صفيحة السلكا في حوض الفصل (Tank) حاوي على 100 ml من محلول الفصل والمكون من (95 كلوروفورم مللتر+ 5 ايثانول مللتر) وبعد وصول نظام الفصل (الطور المتحرك) الى ما قبل 2 cm من حافة الصفيحة العليا اخرجت الصفيحة من حوض الفصل وتركت لتجف بعدها حددت موقع هرمون الاستروجين النباتي بوضع الصفيحة تحت مصباح الاشعة فوق البنفسجية (365)نانوميتر وملاحظة لون البقع الخاصة بعينة مستخلص الفاصوليا ومطابقتها بلون الهرمون القياسي كما

Materials and Methods

حسب معامل التحرك (RF) Relative Flow (RF) لبقع العينة وكذلك للهرمون القياسي. وعلى ضوء ذلك تم تحديد مركب هرمون الاستروجين النباتي في بقع عينة الفاصوليا

من خلال مطابقة موقعها على لوحة TLC بحيث يكون بنفس موقع الهرمون القياسي وكذلك ملاحظة لون المركب ومطابقتها مع لون الهرمون القياسي ايضا بعدها علم موقع الاستروجين النباتي في عينة مستخلص الفاصوليا على لوحة TLC بواسطة قلم للتعليم ,بعدها تم قشط البقع الحاوية على الاستروجين النباتي بواسطة شفرات حادة وكررت عملية الفصل لعدة مرات لحين الحصول على كمية كافية من الاستروجين .

2-3-3 التجربة الثانية experiment 2

صممت هذه التجربة لايجاد الجرعة الوسطية المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على بعض المعايير الحيوية لاناث الارانب ,اذ استخدمت جرع تصاعدية مختلفة من مستخلص الاستروجين النباتي بطريقة الحقن. قسمت عشوائيا 48 من اناث الارانب الى 6 مجاميع وبواقع 8 ارناب لكل مجموعة وجرعت لمدة أربعة أسابيع وعلى النحو التالي:

- 1- المجموعة الاولى تم اعطائها الماء واستخدمت كمجموعه سيطرة G1
 - 2- المجموعة الثانية G2 تم اعطائها 0.07 ملغم/كغم من الاستروجين النباتي
 - 3- المجموعة الثالثة G3 تم اعطائها 0.1 ملغم/كغم من الاستروجين النباتي
 - 4- المجموعة الرابعة G4 تم اعطائها 0.2 ملغم/كغم من الاستروجين النباتي
 - 5- المجموعة الخامسة G5 تم اعطائها 0.5 ملغم/كغم من استروجين النباتي
 - 6- المجموعة السادسة G6 تم اعطائها 0.7 ملغم/كغم من الاستروجين النباتي
- تم سحب عينات الدم في فترة ما قبل المعاملة Pre treated وبعد مرور اربعة اسابيع , وضع الدم بعد ذلك في انابيب خاصة غير حاوية على مادة مانعة للتخثر ثم فصل المصل بواسطة جهاز الطرد المركزي Centerfuge بسرعة 3000 دورة/الدقيقة لمدة 15 دقيقة لقياس المعايير التالية:-

- 1- تركيز الكوليسترول الكلي (Total Cholesterol (TC)
- 2- تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة High Density LipoProtein(HDL)

3-3-3 التجربة الثالثة experiment 3

قسمت 32 من إناث الأرانب عشوائياً وبصورة متساوية على أربع مجاميع (ثمانية لكل مجموعة) طيلة مدة التجربة (1-6) شهر وقد اتبعت طريقة الحقن حسب (Dabbagh et al . ,1997) وكانت المجاميع :-

1 - مجموعة السيطرة **G1** التي لم تتلقى اي معالجة او عملية ازالة المبايض.
2- المجموعة الثانية **G2** تم ازالة المبايض من هذه المجموعة Bilateral Ovaryectomy دون اعطاء اي علاج , لقد تمت العملية تحت ظروف جراحية معقمة إذ تم تخدير الحيوانات باستخدام مزيج من الكيتامين -زيبلازين (40 ملغم /كغم +5 ملغم /كغم من وزن الجسم) . وضع الحيوان في وضع الاستلقاء الظهرى .جرى تحضير بطن الحيوان للعملية الجراحية , عمل شق جراحي في الجلد بطول 4 سم يمتد من السرة باتجاه الخلف ,ثم يزداد 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 الجذعة 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 (Bojrab , 1998) شكل (3-1) .



Materials and Methods

صورة (3) تبين إجراء عملية إزالة المبايض في الأرانب

صورة (3) تبين إجراء عملية إزالة المبايض في اناث الارانب

3 - المجموعة الثالثة G3 وعولمت فقط بالحقن العضلي بأعطاء الجرعة المؤثرة ED50 المستخرجة من التجربة الاولى من الاستروجين النباتي phytoestrogen وبتركيز 0.2 ملغم/كغم لمدة ستة أشهر وبدون عملية إزالة المبايض.

4- المجموعة الرابعة G4 تم إزالة مبايض هذه المجموعة Bilateral oophorectomy , و عولمت بأعطاء الجرعة الوسطية المؤثرة ED50 المستخرجة من التجربة الاولى من الاستروجين النباتي phytoestrogen وبتركيز 0.2 ملغم/كغم.

1-4-3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Test

1-1-4-3 تقدير تركيز المالوندايالديهيد Malondialdehyde (MDA) في مصل الدم

تم قياس المالوندايالديهيد بطريقة حامض الثايوباربيتورك (TBA). حيث تم إضافة 1 مل من مصل الدم الى 3 مل من 1 % حامض الفوسفوريك و 1 مل من 0.6 % حامض الثايوباربيتورك (TBA) و 0.15 مل من هيدروكسي بيوتيليتيد تلون المذيب في 95 % ميثانول . تم وضع المحلول في حمام مائي مغلي لمدة 45 دقيقة . حيث يحصل نتيجة ذلك تفاعل بين المالون ثنائي الالديهيد وحامض الثايوباربيتورك (TBA) ليعطي معقد قرمزي اللون . كما في المعادلة التالية:-



يترك المحلول ليبرد عند درجة حرارة الغرفة , وتضاف 4 مل من البيوتانول ثم يرج المحلول جيداً وينقل إلى جهاز الطرد المركزي عند 3000 دورة بالدقيقة لمدة 10 دقائق . ثم تقاس الامتصاصية للطور الكحولي عند الطول الموجي 532 نانوميتر . يتم إيجاد التركيز باستخدام معامل الامتصاصية:-

$$\varepsilon = 1.53 * 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

الحسابات: نستخرج تركيز المألوندايديهايد من المعادلة التالية

$$\text{serumMDA} = \frac{\text{Absorbance}}{d \times \varepsilon} \times D.F$$

Serum MDA:- تركيز المألوندايالديهايد

الامتصاصية (من الجهاز) Absorbance:-

عرض الخلية (اسم و هو ثابت) d=1

=ε معامل الامتصاصية (ثابت)

5.15معامل التخفيف و يساوي D.F

2-1-4-3 تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم (GSH) Glutathion

كل الطرق المستخدمة لقياس الكلوتاثيون كالطرق التفلورية و الضوئية و

الكروماتوغرافية تعتمد على تحديد مستويات مجموعة السلفهايدريل (Sulfhydryl).

المبدأ:

يتفاعل (DTNB) (2-nitrobenzoic acid) Dithiobis مع السلفهايدريل ليعطي

لون اصفر متألق له امتصاصية تتناسب طرديا مع تركيز الكلوتاثيون.

المحاليل:

1. المحلول المرسب 50% Tri chloroacetic acid (TCA) يحضر بإذابة

50gm من حامض الخليك ثلاثي الكلورايد في 100 ml ماء مقطر.

2. اثلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك: يحضر بإذابة 148.9gm اثلين ثنائي

أمين رباعي حامض الخليك (EDTA-Na₂) واحد لتر ماء مقطر.

3. المحلول المنظم (pH = 8.9) Tris-EDTA (0.4): يحضر بأذابة

48.458 gm من الترس في 800 مل ماء مقطر ثم تضاف 100 ml من

EDTA (0.4M) يكمل الحجم إلى واحد لتر ويضبط الـ pH عند 8.9

1. 4. Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)(DTNB): يحضر بإذابة 0.099

gm من DTNB في 25 مل ايثانول.

Materials and Methods

تحضير منحني الكلوتاثيون القياسي:

يحضر المحلول القياسي (0.001M) بإذابة 0.0307 gm من الكلوتاثيون في

100 مل EDTA (0.4M) وتحضر منه التراكيز (2,5,10,20,30 and)

(40 μ M) باستخدام قانون التخفيف $N_1 V_1 = N_2 V_2$

طريقة القياس:

يتم إضافة الكواشف كما في أدناه:

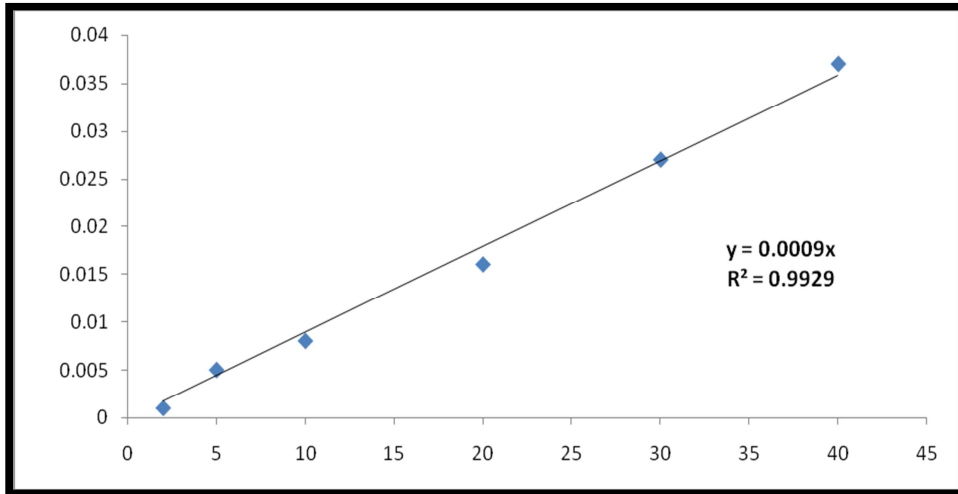
الكاشف	محلول الاختبار	محلول الكفئ	المحلول القياسي
المصل	100	----	----
الكلوتاثيون القياسي	----	----	100
الماء المقطر	800	900	100
TCA	100	100	100

يرج المحلول جيدا و ينقل إلى جهاز الطرد المركزي عند 3000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة. بعدها نسحب الكميات المقابلة.

Materials and Methods

المحلول القياسي lμ	الكفي lμ	النموذج lμ	lμ الكاشف
400	400	400	الراشح
800	800	800	Tris EDTA buffer
20	20	20	DTNB reagent

ترج الأنابيب جيداً و تقاس الامتصاصية عند طول موجي 412 نانو متر و يحسب التركيز من المنحني القياسي أدناه:



الشكل (2-3) المنحني القياسي للكلوتاتايون

3-1-4-3 تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم Serum Total

Cholesterol Concentrations(TC)

تم تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم بالطريقة الإنزيمية وفقاً لطريقة

(Allani, 1974) إذ تعتمد هذه الطريقة على تحويل Cholesterol Esterase

بوجود الأوكسجين (O²)

وإنزيم Cholesterol Oxidase اللذان يعملان على أكسدة الكوليستيرول الحر

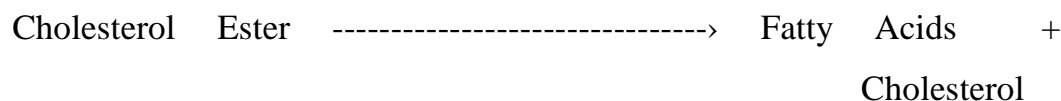
المتكون نتيجة التفاعل الأول إلى (Cholest - 4 en - 3 one) و (Hydrogen

Peroxidase) وهذا الأخير

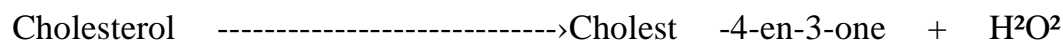
Materials and Methods

يتفاعل مع الفينول Phenol و 4-Aminoantiprinel بوجود أنزيم Peroxidase ليكون كيتون أمين Quinoneimine وردي اللون وكما موضح في المعادلات التالية :-

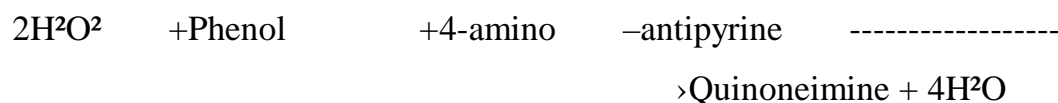
Cholesterol Estrase



Cholesterol Oxidase



n.



Enzym

طريقة العمل

تم استخدام ثلاثة أنابيب اختبار هي العينة sample , المحلول القياسي standard والكفء blank وحسب الجدول التالي :

المحاليل	Blank	Sample	Standard
Sample	----	10 μ	----
Standard	----	----	10μ
Blank	10μ	----	----
Reagent (a)	1.0 ml	1.0 ml	1.0ml

بعدها أضيف 1.0 ml من reagent a إلى العينة والمحلول القياسي والكفء ومزجت المحاليل جيداً وتركت لمدة 5 دقائق في الحمام المائي بدرجة 37 مئوية

Materials and Methods

وبعدها تم قراءة الامتصاصية لها بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 510 نانوميتر وذلك بعد تصفير الجهاز بواسطة الكفيء .

الحسابات

تم حساب تركيز الكوليسترول الكلي وفقاً للقانون التالي :-

$$\text{Sample } \times n \\ \text{Total Cholesterol M/ dL} = \frac{\text{Sample}}{\text{Standard}} \times N \\ \text{Standard}$$

أذ إن :

$200 = N$ وهو تركيز المحلول القياسي .

Sample = الامتصاصية الضوئية لعينة المصل .

Standard = الامتصاصية الضوئية للمحلول القياسي .

4-1-4-3 تقدير تركيز الشحوم البروتينية العالية الكثافة High

Lipoproteins (HDL) density

تم تقدير تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL بالطريقة الإنزيمية وفقاً لطريقة (Burstein , 1970) وتعتمد هذه الطريقة على ترسيب دقائق الاستحلاب (الكيلوسية) و LDL و VLDL والموجودة في مصل الدم ويتم ذلك بإضافة معامل الترسيب Precipitating reagent إلى مصل العينات وبعد الانتهاء من هذه العملية وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي علماً إن المحلول الناتج بعد عملية الترسيب رائق ويحوي على HDL والذي يمكن قياس مستوى الكوليستيرول فيه باستخدام الكاشف Reagent A من العدة الخاصة بتقدير مستوى الكوليستيرول .

طريقة العمل

تتضمن طريقة العمل في تقدير مستوى HDL خطوتين هما :-

1 - الترسيب استخدمت هذه الخطوة لتحضير الراشح (الرائق) وذلك بإضافة 0.5 مل من محلول الترسيب Reagent 1 إلى 0.5 مل من مصل الدم ويمزج جيداً ويترك

Materials and Methods

لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة , ثم يوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعة 3000 دورة / دقيقة .

2- تقدير كمية HDL

قسم العمل على ثلاثة أنابيب اختبار هي (العينة , المحلول القياسي , الكفيء)

المحاليل	Blank	Sample	Standard
محلول رائق من sample	----	0.5µ	---
Standard	---	---	0.5µ
Blank	0.5µ		
Working Reagent	2.0ml	2.0ml	2.0ml

بعدها أضيف 2.0 مل من Reagent إلى المحاليل الثلاثة المذكورة أعلاه ومزجت جيداً ثم تركت لمدة 5 دقائق في الحمام المائي بدرجة حرارة 37 مئوية وبعدها تقرأ الامتصاصية بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 510 نانوميتر .
الحسابات

تم حساب تركيز HDL cholesterol من القانون التالي :

$$\text{HDL -c Cocentration} = \frac{\text{sample}}{\text{Standard}} \times \text{STD C.} \times 2$$

Standard

أذ إن :

$$\text{C. STD} = \text{قيمة المحلول القياسي وتقدر } 50 \text{ mg / dl}$$

$$(2) = \text{عامل التخفيف بالمزج مع عامل الترسيب Precipitating reagent}$$

عينات الدم

Materials and Methods

تم سحب 10 مل من الدم من القلب عن طريق طعنة القلب heart Puncture بواسطة محقنة طبية لسحب الدم لإجراء الفحوصات الكيموحيوية Ca , ALP , (P)، وقياس الهرمونات (Estradiol , FSH, LH) وبعد ذلك وضع الدم بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة وقد تم حفظ الامصال في ثلاجة Refrigerator في درجة حرارة (4°C) لحين اتمام القياسات.

5-1-4-3 قياس تركيز الكالسيوم Measurement of Calcium Concentration

تم قياس تركيز الكالسيوم في مصل الدم بأستخدام جهاز تحليل العناصر (الألكترولايت) حيث وضع واحد مل من عينة المصل المحفوظة في المكان المخصص لها في الجهاز ويسمى مكان الشفط Aspirator وتم الضغط على زر البدء بالقياس فتشفت عينة المصل الموضوع في الجهاز، تعرض النتائج خلال دقيقة عن طريق الطابعة المربوطة مع الجهاز على ورق وتخزن النتائج ايضا في ذاكرة الطابعة.

6-1-4-3 قياس تركيز Alkaline phosphates ALP

تم استعمال عدة الاختبار الجاهزة المصنعة من قبل شركة Teco Diagnostics لقياس مستوى فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP) وهي طريقة انزيمية . حيث تم تعيين فعالية انزيم (ALP) في مصل الدم بالطريقة اللونية بقياس الكثافة اللونية (Kaplan, 1972).

7-1-4-3 قياس تركيز هرمون الاستروجين Estimate of Estrogen hormone Concentration

يتم قياس الهرمون في مستوى مصل الدم المأخوذ من حيوانات المجموعة الأولى (G1) وحيوانات المجموعة الثانية (G2) ومجموعة G3 ومجموعة G4 وذلك بإتباع الخطوات المرافقة مع عدة الفحص الخاصة المتكونة من المواد الآتية:-
1- أشرطة (STR) الخاصة بهرمون Esteroidal : وهي أشرطة جاهزة للاستعمال من 10 حفر wells مغطاة بصفيحة رقيقة ومعلمة برمز Estradiol لغرض تمييزها

Materials and Methods

- 2 - Solid phase receptacles (SPRs) : وهي جاهزة للاستعمال تشبه تماماً (tip) المستعمل في الماصة الدقيقة إلا أنها معلمة في نهايتها العريضة بالرمز Estradiol لغرض تمييزها .
- 3 - Estradiol control (C1) : تم تحضيره بإضافة 3 مل 3 من الماء المقطر ويترك لمدة 5-10 دقائق .
- 4 - Estradiol calibrator (S1) : تم تحضيره بإضافة 2 مل 3 من الماء المقطر ويترك لمدة 5 - 10 دقائق .
- 5 - Estradiol dilutant (R1) : وهو جاهز للاستعمال .
- 6 - بطاقة Mle : وهي بطاقة جاهزة تحتوي على المعلومات المشفرة الرئيسية لبيانات المعايرة المستخدمة في تقويم الاختبار الخاص بتركيز هرمون الاستيرايديول .
- اعتمد مبدأ قياس تركيز هرمون الاستيرايديول على طريقة Enzyme immunoassay sandwich method with a final Fluorescent detection

وتعمل مستلمات الطور الصلب (SPRs) عمل الطور الصلب فضلاً عن عملها أداة ماصة في الوقت نفسه لأجل المعايرة . أما المحاليل المستخدمة في المعايرة فهي محاليل جاهزة ومحضرة على أشرطة مختومة Sealed reagents strips مثلما هو موضح سابقاً .

أنجزت خطوات المعايرة أو القياس جميعاً بشكل أوتوماتيكي عن طريق جهاز Minvidas حيث يتحرك وسط التفاعل بشكل دوري من وإلى SPRs والمحاليل الموجودة مرات عدة .

تم نقل العينة إلى داخل الحفرة الحاوية على Anti-Esteriodl - antibodies المعلمة Alkaline phosphates الرابطة . ويتحرك خليط (العينة / الرابطة) بشكل دوري من وإلى SPRs , وبهذا يرتبط المستضد بالأجسام المضادة SPR وكذلك بالرابطة مكوناً بعد ذلك الشطيرة Sandwich .

خلال الخطوات النهائية من المعايرة تتحرك المادة الأساس 4-methly- umbiliferone phosphate بشكل دوري من وإلى SPRs . ويقوم الإنزيم بعد ذلك بتحلل المادة الأساس إلى الناتج المشع وهو 4-methly- umbiliferone الذي يتم

Materials and Methods

قياس كمية الإشعاع فيه على طول موجي (450 نانوميتر) , وتعتمد شدة الإشعاع على التركيز النسبي للمستضد الموجود في العينة وفي نهاية المعايرة حسب النتيجة بشكل أوتوماتيكي عن طريق الجهاز اعتماداً على المنحني القياسي المخزون في ذاكرة الجهاز وبعدها تم طباعة النتيجة عن طريق الجهاز أيضاً.

طريقة العمل

تتضمن طريقة العمل الخطوات الآتية :-

1- وضعت بطاقة M / e الخاصة بعدة الفحص في المكان المخصص لها في جهاز Minividas ليتعرف عن طريقها على الاختبار بشكل أوتوماتيكي آذ بدونها لا يتمكن الجهاز من أظهار النتيجة ومن ثم طباعتها .

2- تم استخدام شريط STR & SPR واحد لكل عينة من مصل الدم القياسي والسيطرة Standard & Control وتوضع في المكان المخصص لها في الجهاز .

3- تم سحب 100 ml من عينة مصل الدم ووضع في الحفرة (1) الخاصة بها على شريط (STR) Strip ويتم ذلك لمصل الدم القياسي والسيطرة .

4- تم أتباع الخطوات الخاصة بالجهاز والموجودة في الـ MANUAL الخاص بالجهاز , ليقوم الجهاز بالبدا بعملية المعايرة بشكل أوتوماتيكي والتي تستغرق مدة 45 دقيقة .

5- بعد أن تمت المعايرة وطباعة النتائج استخرجت STR و SPR من الجهاز ووضع في حاوية خاصة تستعمل لمرة واحدة فقط .

3-4-1-8 قياس تركيز هرمون محفز الجريبات Estimate of follicular stimulating hormone Concentration (FSH)

يتم قياس تركيز الهرمون وذلك بإتباع الخطوات المرافقة مع عدة الفحص الخاصة

بهرمون FSH المتكون من المواد الآتية :

1-أشرطة (STR) Strips الخاصة بهرمون FSH : وهي أشرطة جاهزة للاستعمال من 10 حفر wells مغطاة بصفيحة رقيقة ومعلمة برمز FSH , لغرض تمييزها .

Materials and Methods

2 - Solid phase receptacles (SPRs) : وهي جاهزة للاستعمال تشبه تماماً (tip) المستعمل في الماصة الدقيقة الا انها معلمة في نهايتها العريضة بالرمز FSH لغرض تمييزها .

3 - (C1) FSH control : تم تحضيره باضافة 3 مل 3 من الماء المقطر ويترك لمدة 5-10 دقائق .

4 - (S1) FSH calibrator : تم تحضيره باضافة 2 مل 3 من الماء المقطر ويترك لمدة 5 - 10 دقائق .

5 - (R1) FSH dilutant وهو جاهز للاستعمال .

6 - بطاقة M/e وهي بطاقة جاهزة تحتوي على المعلومات المشفرة الرئيسية لبيانات المعايرة المستخدمة في تقويم الاختبار الخاص بتركيز الهرمون المحفز للجريبات . اعتمد مبدأ قياس تركيز الهرمون المحفز للجريبات على طريقة Enzyme immunoassay sandwich method with a final Fluorescent detection دوري من والى SPRs . ويقوم الأنزيم بعد ذلك بتحليل المادة الأساس الى الناتج المشع وهو 4-Methly- umbliferone الذي يتم قياس كمية الإشعاع فيه على

طول موجي (450 نانوميتر) , وتعتمد شدة الإشعاع على التركيز النسبي للمستضد الموجود في العينة . وفي نهاية المعايرة حسب النتيجة اتوماتيكي عن طريق الجهاز اعتمداً على المنحني القياسي المخزون في ذاكرة الجهاز وبعدها تم طباعة النتيجة عن طريق الجهاز أيضا .

طريقة العمل

تتضمن طريقة العمل الخطوات الآتية :

1 - وضعت بطاقة M / e الخاصة بعدة الفحص في المكان المخصص لها في جهاز Minividas ليتعرف عن طريقها على الاختبار بشكل اتوماتيكي إذ بدونها لا يتمكن الجهاز من أظهار النتيجة ومن ثم طباعتها .

2 - تم استخدام شريط SPR & STR واحد لكل من مصل الدم القياسي والسيطرة Standard & Control وتوضع في المكان المخصص لها في الجهاز .

3 - تم سحب 100 µl من عينة مصل الدم وتوضع في الحفرة (1) الخاصة بها على الشريط (STR) Strip ويتم ذلك لمصل الدم القياسي والسيطرة .

Materials and Methods

- 4 - تم أتباع الخطوات الخاصة بالجهاز والموجودة في الـ manual الخاص بالجهاز .
ليقوم الجهاز بالبدا بعملية المعايرة اتوماتيكي والتي تستغرق مدة 45 دقيقة .
- 5 - بعد ان تمت المعايرة وطباعة النتائج استخرجت STR و SPR من الجهاز
ووضعت في حاوية خاصة تستعمل لمرة واحدة فقط .

9-1-4-3 قياس تركيز الهرمون اللوتيني LH Estimate of LH Concentration

تم قياس الهرمون اللوتيني بأتباع الخطوات المرافقة مع عدة الفحص الخاصة
بالهرمون اللوتيني المتكونة من المواد الآتية:

- 1 -أشرطة Strips الخاصة بالهرمون اللوتيني LH وهي جاهزة للاستعمال ومثلما
هو الحال في أشرطة الهرمون المحفز للجريبات FSH , فهي تتكون من عشر حفر .
- 2 - Solid Phosereceptacles (SPR2) : وهي جاهزة للاستعمال مشابهة تماماً
الى SPR2 الخاصة بهرمون المحفز للجريبات الا انها معلمة بالهرمون اللوتيني .
- 3- LH Control (C1) : تم تحضيره بإضافة 3 ملم³ من الماء المقطر
ويترك لمدة 5-10 دقائق .

- 4 - LH Calibrator (S1) : تم تحضيره بإضافة 2 ملم³ من الماء المقطر
ويترك لمدة 5-10 دقائق .

- 5 - LH dilutant (R1) : وهو جاهز للاستعمال .

- 6 - بطاقة M/e : وهي بطاقة جاهزة تحتوي على المعلومات المشفرة الرئيسية
ليانات المعايرة المستخدمة في تقويم نتيجة الاختبار الخاص بتركيز الهرمون اللوتيني .

اعتمد مبدأ قياس تركيز هرمون LH أيضاً على Combines enzyme
immunoassay sandwich method with a final Fluorescent detection
إذ يحدث تنافس بين المستضد الموجود في العينة و المستضد المعلم بـ Anti-LH
antibodies المغطية للـ SPR1 وفي النهاية يتكون ناتج مشع تم قياس كمية هذا
الإشعاع عن طريق الجهاز بشكل اتوماتيكي . أما بالنسبة لطريقة العمل فقد تم أتباع
الطريقة ذاتها المستخدمة في أثناء قياس الهرمون المحفز للجريبات .

5-3-التحضيرات النسجية Histological preparations

Materials and Methods

تم حفظ العينة لمقطع نسيج العظم ونسيج الرحم في البداية بعد استئصالها من الحيوان في محلول الفورمالين بتركيز 10 % وبعد 4-5 ايام استخرجت من الفورمالين وغسلت عدة مرات بالكحول الايثيلي بتركيز 70% بعدها اجريت عليها سلسلة من العمليات اعتماداً على الطريقة الموصوفة في (Presnell and Schreibman, 1997). ثم تم تصوير المقاطع النسيجية للعظم والرحم باستخدام كاميرا رقمية Digital Camera عالية الدقة .

1- الانكاز والترويق Dehydration and Clearing

تم سحب الماء من النسيج وذلك بتمرير النماذج في سلسلة تراكيز تصاعديّة من الكحول الايثيلي (70%، 80%، 90%، 95%، 100%) ولمدة ساعتين في كل تركيز بعدها روقت النماذج بوضعها في الزايلين لمدة ساعتين.

2- التشريب Infiltration

بعد الانتهاء من عملية الترويق نقلت النماذج الى قناني حاوية على خليط من شمع البرافين Paraffin wax (ذي درجة انصهار 57-60 م) المنصهر والمرشح والزايلين بنسبة 1:1 لمدة نصف ساعة داخل فرن كهربائي درجة حرارته 60 م وذلك لابقاء الشمع منصهراً ولضمان تمام عملية التشريب الكامل للنماذج بالشمع نقلت الى

قناني اخرى حاوية على شمع البرافين داخل الفرن ايضاً لمدة ساعة واحدة ثم نقل مرة اخرى الى قناني اخرى حاوية على شمع البرافين لمدة ساعة واحدة ايضاً.

3- الطمر Embedding

تم عمل قوالب من الشمع حاوية على نماذج العينات وذلك بصب الشمع في قوالب بلاستيكية خاصة طمرت فيها النماذج وتركت في درجة حرارة المختبر لتتصلب ثم فصلت عن القالب وحفظت حتى وقت تقطيعها

4- التقطيع Sectioning

تم استخدام جهاز المشراح اليدوي Rotary Microtome لتقطيع النماذج وبسمك تراوح ما بين 5-6 مايكروميتر، ثم حملت اشربة المقاطع على شرائح زجاجية Slides نظيفة وممسوحة بأح ماير بعد ان وضعت في حمام مائي درجة حرارته 45-50 م لمدة دقيقة- دقيقتين لضمان فرش المقاطع بعدها تركت على صفيحة ساخنة Hot Plate لتجف بدرجة حرارة 37 م.

5- التصبغ والتحميل staining and Mounting

صبغت جميع المقاطع النسيجية باستخدام صبغة هيماتوكسولين-ايوسين Haematoxylin-Eosin stain اذ وضعت الشرائح في الزايلين لمدة 5 دقائق للتخلص من الشمع ثم مررت بسلسلة تراكيز تنازلية من الكحول الايثيلي (100%، 90%، 80%، 70%، 50%) لمدة دقيقتين في كل تركيز بعدها صبغت بصبغة الهيماتوكسولين لمدة دقيقة واحدة ثم غسلت بالماء المقطر لمدة دقيقتين بعدها غطست بالكحول الحامضي لمرتين او ثلاث مرات لازالة الصبغة الزائدة ثم صبغت بصبغة الايوسين لمدة ربع دقيقة ونقلت بعدها الى سلسلة تصاعدية من الكحول الايثيلي (50%، 70%، 80%، 90%، 95%، 100%) ولمدة دقيقتين في كل تركيز ما عدا التركيز الاخير

وضعت فيه لمدة 5 دقائق ثم روقت بالزايلين بمرحلتين في كل مرحلة لمدة 10 دقائق بعدها اجريت عليها عملية التحميل باستخدام بلسم كندا Canada Balsam لتثبيت غطاء الشريحة ثم تركت على صفيحة ساخنة لتجف لمدة 8 ساعات لتكون جاهزة للفحص .

3-5 التصوير المجهرى Microphotography

تم تصوير المقاطع النسيجية باستخدام مجهر ضوئي نوع Olympus light microscope مزود بكاميرا رقمية Digital Camera نوع Olympus عالية الدقة.

3-6 الدراسة الجزيئية

- 3-6-1 فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي

Quantitative Real-Tim PCR qRT-PCR

اجري فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي و (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس المستويات الكمية للحامض النووي المراسل mRNA لكي نستدل على

Materials and Methods

مقدار التعبير الجيني Gene expression لجينات collagen- I, fibronectin, (and kappa-B) في أنسجة العظم لآناث الارانب بالتجربة للمجاميع المعالجة مقارنة بمجموعة السيطرة، كذلك تم استخدام جين β -actin والذي يستعمل كجين منظم قياسي لحساب التعبير الجيني. اجري الفحص تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل (Wang and Hardy, 2004) وكما يلي :

1- استخلاص الحامض النووي الرايبوزي الكلي Total RNA extraction

تم استخلاص الحمض النووي الرايبوزي الكلي من أنسجة العظم وذلك باستخدام عدة (TRIZol® reagent kit) المجهز من قبل شركة بايونير الكورية وتم العمل بالعدة حسب تعليمات الشركة كما في الخطوات التالية:-

1- طحن عظم الفخذ والساعد لأنسجة الارنب ومجانستها بزواسطة النيتروجين السائل، ثم نقل باودر الانسجة الى انابيب ابندروف واطافة 1 ml لمادة TRIZol® . reagent kit بعدها رجت الانابيب لمدة 30 ثانية.

2- اضافة 200µl من الكلوروفورم لكل انبوب ورجت ايضا لمدة 30 ثانية.

3- الخليط حضن على الثلج لمدة 5 دقائق. بعدها وضع في جهاز الطرد المركزي 12000 rpm بدرجة حرارة 4°C لمدة 15 دقيقة .

4- نقلت الطبقة العليا الشفافة الى انبوبة ابندروف جديدة واطيف اليه كمية 500µl من

الايثوبروبانول .

5- مزج الخليط بواسطة تقليب الانبوبة 4-5 مرات وحضن بدرجة 4°C لمدة 10 دقائق ووضع الخليط بجهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق للتخلص من الطافي وبقاء الراسب بالانبوبة.

6- اضيف للراسب 1 مل من الايثانول بتركيز 80% والتي مزجت جيدا بواسطة جهاز vortex .

7- الانابيب دخلت بجهاز الطرد المركزي بدرجة حرارة 4 م° لمدة 5 دقائق وبسرعة 12000 rpm .

Materials and Methods

- 8- نتخلص من الطافي ونأخذ المترسب pellet من RNA وترك لكي يجف بالهواء.
- 9- اضيف للراسب 50µl DEPC (Diethyl PyroCarbonate) الماء الذي يضاف الى راسب ال RNA ويخلط بواسطة الرج المستمر بجهاز ال vortex حتى يفصل.
- 10- يحفظ مستخلص ال RNA بدرجة 20- مئوية .

3-6-2- المعاملة بانزيم DNase I Treatment

تم معاملة المستخلص من الحمض النووي RNA بأستخدام انزيم DNase I للتخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص وذلك بالاعتماد على طريقة عمل عدة الانزيم كما في الجدول الاتي :

Mix	volume
Total RNA	10 µl
DNase I enzyme	1 µl
10x buffer	2 µl
Free RNase water	7 µl
Total	20 µl

بعد ذلك تم حضن المزيج في الحاضنة بدرجة حرارة 37°C لمدة نصف ساعة، وبعدها اضيف 1 ميكروليتر من مادة ال EDTA 25mM of 1µl وحضنت لمدة 10 دقائق بدرجة 65°C وذلك لتثبيط فعالية انزيم DNase .

3-6-3- قياس ونقاوة الحامض النووي الرايبوزي Assessment of

Total RNA concentration and purity

المستخلص الكلي للحامض النووي الرايبوزي RNA كشف عنه بقياسه بواسطة Nanodrop spectrophotometer,(Thermo. USA) عن طريق تحديد تركيز

Materials and Methods

الحامض النووي الرايبوزي RNA (ng/ μ L) اولا ثم قياس نقاوة الحامض النووي الرايبوزي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بنسبة 1.8 في (260/280 nm) وللتأكد من وجود الحامض النووي باستخدام الترحيل الكهربائي على النحو التالي :-

بعد تشغيل جهاز Nanodrop software حيث تم اختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع RNA ونقوم بتصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من (ddH₂O) باستخدام مايكروباييت معقمة على سطح ركيزة المقياس وجراء التصفير وبعدها نقوم بتنظيف الركيزة لقياس العينات .

نقوم بالضغط على الزر ok لبدء عملية قياس تركيز ال RNA باستخدام 1 ميكروليتر من كل من ال RNA المستخلص ومن ثم نقوم بتنظيف ركيزة المقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى .وكذلك تم تحديد نقاوة عينات ال RNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectorphotometer على طولي الموجين (260nm\280nm) اذ ان الحمض النووي الرايبوزي المستخلص يعد نقيا عندما يكون نسبة الامتصاصية هي (1.8) بعد ذلك نقوم باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel electrophosis ترحيل الحمض انوي RNA ذلك لتحديد سلامة (Integrity) ال RNA من التحليل بفعل الانزيمات المحللة . وتم اجراء هذه الطريقة كالاتي :

تم تحضير 1% من هلام الاكاروز بإذابته بمحلول 1x TBE buffer ونغليه باستخدام Hot Magnetic stirrer لمدة 15 دقيقة لحين ذوبان البلورات في محلول الاكاروز.

بعد ان يبرد نظيف 3 مايكروليتر من بروميد الاثيديوم للمحلول ويوضع الجل في قالب صب الهلام tary بعد تثبيت مشط لتكوين الحفر قرب احد نهاية الجل وعلى بعد 1 سم من طرف القالب وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة .بعدها ينقل الى جهاز الترحيل الكهربائي والذي يحتوي على محلول 1x TBE buffer .

حضرت عينات RNA لغرض اجراء عملية التحميل (LOADING) بمزج 25 مايكروليتر من عينة الحمض النووي RNA مع 5 مايكروليتر من دارى التحميل ونقلت العينة الى احدى حفر الهلام. تم ترحيل العينات بامرار فرق جهد قدره 100 فولت لمدة ساعة .

Materials and Methods

تم فحص مواقع حزم الحمض النووي RNA المستخلص عند الطول الموجي 226 nm ثم صور الهلام لغرض توثيق النتائج .

4-6-3 طريقة تصنيع ال cDNA Synthesis

تم استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي cDNA المكمل للـ DNA من عينات الحمض النووي للـ RNA المستخلص باستخدام عدة Accupower Rockcript RT Premix Kit المجهزة من قبل شركة بايونير الكورية . وتم اجراء هذه العملية بحسب طريقة عمل العدة كما في الجدول الاتي :

cDNA master mix	Volume
Total RNA	10 μ L
Oligo(dT) 15 primer 10 pmole	2 μ L
DEPC water	8 μ L
Total	20 μL

بعد ذلك تم اضافة مكونات المزيج RT Master Mix التي ذكرت في الجدول اعلاه الى انابيب عده تصنيع cDNA والحاوية على انزيم الاستنساخ العكسي Reverse Transcription ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin) Vortex Centerifuge بسرعة 3000rPM لمدة ثلاثه دقائق . بعد ذلك تم نقل الانابيب الى جهاز الدوار الحراري (Mygene.Korea) Thermocycler وتم تطبيق البرنامج الحراري لعملية تصنيع ال cDNA بحسب طريقة عمل العده كما في الجدول الاتي :

Materials and Methods

Step	Cycle	Temperature	Time
cDNA synthesis	1	50°C	1 hour
Heat inactivation	1	95°C	5 minutes

بعد ذلك نقلت العينات للحفظ بدرجة -20 لحين استخدامها في فحص Real-Time PCR).

3-10-5 فحص Quantitative Real Time PCR (qPCR)

تم اجراء فحص qPCR لعينات ال cDNA وكذلك لتحديد مستوى التعبير الجيني لجينات (collagen- I, fibronectin, and kappa-B gene) وكذلك لجين المحافظ القياسي β -Actin اذ تم استخدام عده (AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master mix kit, Bioneer. Korea), المجهزه من قبل شركة بايونير الكورية , لاجراء هذا الفحص والحاوي على صبغه السايبر الخضراء والتي تتفاعل مع الجينات المتضخمه في جهاز ال Real-Time PCR وقد تم اجراء الفحص بحسب طريقة (Prasanthi,et ,al, 2011.) كما يأتي :

qPCR master mix	Volume
2X Green star master mix	25 μ L
cDNA template (10ng/ μ L)	10 μ L
Forward primer (10pmol)	1 μ L
Reverse primer (10pmol)	1 μ L

Materials and Methods

DEPC water	13 μ L
Total	50μL

بعد ذلك تم اضافة هذه المكونات التي ذكرت في الجدول اعلاه الى انابيب عده
 Accupower2x Greenstar qPCR Master Mix والحاوية على مزيج تفاعل
 صبغة السايبر الخضراء لفحص Quantitative Real-Time PCR . ومن ثم
 وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج Vortex Centrifuge
 (Exispin) بسرعة 3000rPM لمدة ثلاثة دقائق . وبعدها نقلت صفيحة جهاز
 Real Time PCR Thermocycler (-Time PCR .. USA) وتم تطبيق الظروف الحرارية
 Conditions لكل الجينات حسب طريقة عمل عده كما في الجدول الاتي

Step	Condition	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C 5 min	1
Denaturation	95 °C 20 sec	45
Annealing/Extension	60 °C 30 sec	

Materials and Methods

Detection (Scan)		
Melting curve	60-95°C	1

3-10-6 طريقة تحليل البيانات : Real- Time PCR Data Anlysis

تم تحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة Livak Method والتي وضعت من قبل Livak And (2001) Schmittgen, والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية (Relative Quantitive) والكمية المطلقة (Absolute Quantitive) من خلال عملية تصحيح ومعادلة الجينات الهدف مع عينات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بايولوجي كل عينة من عينات الهدف تصحح مع عينه السيطرة لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي وكما في المعادلات التالية :

	Test	Calibrator (cal)
Target gene	CT(target, test)	CT(target, cal)
Reference gene	CT(ref, test)	CT(ref, cal)

First, normalize the CT of the reference (ref) gene to that of the target gene, for calibrator sample:

$$\Delta CT (\text{calibrator}) = CT (\text{ref, calibrator}) - CT (\text{target, calibrator})$$

$$\text{Ratio (reference/target)} = 2^{CT (\text{reference}) - CT (\text{target})}$$

Second, normalize the CT of the reference (ref) gene to that of the target gene, for the test sample:

$$\Delta CT (\text{Test}) = CT (\text{ref, test}) - CT (\text{target, test})$$

$$\text{Ratio (reference/target)} = 2^{CT (\text{reference}) - CT (\text{target})}$$

Materials and Methods

So, the relative expression was divided by the expression value of a chosen calibrator for each expression ratio of test sample.

3-7-7- قياس الفعالية الحيوية للخلايا cell viability assay

تم اجراء اختبار (Microtiter plate colorimetric assay (MTT) لقياس الفعالية الحيوية للخلايا العظمية بعد المعاملة بالاستروجين النباتي تم اذابة 5 ملغرام من المستخلص المجفف في 1 مل من الماء المقطر بعد ذلك تم تحضير تراكيز تصاعديّة من المستخلص 5 ملغم/مل بالتخفيف بالوسط الزرع الخاص بخلايا العظم (DMEM (Dubleco's modified Eagl medium media التي تحتوي على 2% من مصّل الجنين البقري (FBS) Fetal Bovine Serum يتم زراعة خلايا العظم بتركيز 1*10 cell/well في اطباق at well plates تم تنمية الخلايا في ظروف القياسية تتضمن مستوى 5% من CO2 وحرارة 37C ورطوبة مناسبة في حاضنة الخلايا لمدة

24, 48, 72 ساعة بعد ازالة الوسط الزرع تحت اضافة التراكيز مختلفة من الاستروجين النباتي وهي (12.5, 25, 50, 100, 200, 400) مايكروغرام / مل مخففة بالوسط الزرع كما ذكر اعلاه بعد الحضانة لمدة 24, 48, 72 ساعة تحت اضافة 10 مايكروولتر 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 dmsو والقراءة عند الطول الموجي 570nm بجهاز قياس الكثافة الضوئية

Tecan infinite M 200 نوع micro plate reader

Percentage of viability=(Absorbance of treated cells / Absorbance of untreated cells) *100

النسبة المئوية لفعالية الخلايا تساوي الامتصاصية للخلايا المعالجة على الامتصاصية للخلايا غير المعالجة مضروب بمئة

3-7-1- تقدير الفعالية الجينية Assessment of gene Expression

في هذه التجربة تم تقدير الفعالية الجينية للجينات المسؤولة عن بناء المادة البينية للنسيج العظمي والتي تعكس فعالية ونشاط الخلايا العظمية Osteoblast تم زراعة خلايا العظم Osteoblast بتركيز 2*10 في وعاء زرع نوعي T75 وحفظت الخلايا في الظروف القياسية (5% CO2, 37c) اثنان من الاوعية الزرع T75 استخدمت لكل

Materials and Methods

جين تحت الدراسة وهي الكولاجين I والفايبرونكتين تحت معاملة الخلايا بتركيزين مختلفين من الاستروجين النباتي وهي 25, 50 مايكروغرام / مل والتي هي ادني من مستوى السام للخلايا وحفظ وعائين بدون معاملة كمجموعة السيطرة Control بعدها حفظت الخلايا لمدة 48 ساعة في الحاضنة .

2-7-3 - استخلاص ال RNA الكلي Total RNA Extraction

بعد انتهاء فترة الحضانة (48 ساعة) تمت ازالة الوسط الزرعى و اضافة انزيم التريبسين لغرض فصل الخلايا عن سطح الوعاء الزرعى trypsinization تم جمع الخلايا بالطرد المركزي واستخدام طريقة trizol reagent لغرض استخلاص ال RNA .

3-7-3 ازالة ال DNA الجينومي genomic DNA من عينة ال RNA

تمت هذه المعاملة لغرض الحصول على العينات RNA نقية وخالية من بقايا الحامض النووي 3 الجينومي GENOMIC DNA لغرض تقدير فقط مستوى ال RNA الناتج من نشاط الجين تحت الدراسة بعد الحصول على ال RNA يتم حضنة مع انزيم الهاضم لل DNA ويسمى DNase I .

4-7-3 تحضير ال DNA المتمم من عينة ال RNA)cDNA**(Preparation**

تم تحويل ال RNA الى cDNA بواسطة مجموعة ال DNATranscription المتوفرة لدى شركة Applied ,Biosystem,USA .

5-7-3 استخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الكمي QRT.PCR

اجريت هذه التقنية باستخدام جهاز (Applied Biosystem) ABI 7500 والصبغة المشعة ضوئيا Syber green fluorescence dye لدى شركة appliedbiosystem ,usa النشاط الجيني للجينات تحت الدراسة تمت معايرته بنشاط

احدى الجينات ذات الفعالية الثابتة والتي لاتتأثر بالمعادلة مثل بيتا اكتين β -actin والذي يسمى الجين الداخلي indogenous gene .

6-7-3 تصميم البادئات Primer لتفاعل سلسلة البلمرة PCR

Materials and Methods

المعلومات الوراثية للجينات تحت الدراسة تم الحصول عليها من بنك الجينات GEN Bank البادئات الامامية forward primer والخلفية reverse primers تم تصميمها لكل الجينات تحت الدراسة ليكون طول القطعة الـ DNA الناتجة من تفاعل البلمرة replicon تقريبا 100 زوج من القواعد النتروجينية (bp 100) قبل البدء بتفاعل البلمرة الاتي Real Time PCR اولاً تم اجراء تفاعل البلمرة التقليدي conventional PCR والتأكد من جودة البادئات ولغرض التأكد من خصوصية تفاعل البادئات Primer specificity اجري تفاعل تخصص البادئات melting cure يشير الجدول رقم (1-3) رمز الجينات من قبل الجينات gene bank وتسلسل القواعد النتروجينية للبادئات الامامية forward primer والخلفية reverse primer والى درجة الحرارة التي ينفصل عندها البادئ primer عن شريط الـ DNA وتسمى Melting TEMPTM تم تحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة البلمرة الـ RT PCR, وحسب دراسة (Book out mangeladorf 2003) .

8-3 التحليل الاحصائي

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 العياريية المستخدمة في تحديد المتوسط Mean والخطأ القياسي عند مستوى دلالة $p < 0.05$ (الراوي، 2000).

الفصل الرابع
النتائج

Results

1-4 التجربة الاولى- استخلاص (لاستروجين النباتي) Phytoestrogen من حبوب الفاصولياء البيضاء المجففة

بعد طحن حبوب الفاصولياء المجففة بواسطة الخلاط الكهربائي استخدم جهاز السكسليت لغرض فصل المستخلص وقد استخدم هرمون الايستراديول القياسي $17-\beta$ Esterdiol للمقارنة والكشف عن مستخلص الاستروجين النباتي Phytoestrogen. تم الحصول على المستخلص تم حفظه بقناني زجاجية ليخضع الى التجربة الثانية وهي تحديد الجرعة المؤثرة.

2-4 التجربة الثانية تحديد الجرعة المؤثرة لمستخلص الاستروجين النباتي Determination of ED50 of Phytoestrogen extract

تم قياس الجرعة المؤثرة ED50 من خلال دراسة منحنى الاستجابة للجرع المختلفة Dose response curve, وقد استخدمت 5 جرع تصاعديّة 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 اسابيع كما مبين في الجداول (1-4)، (2-4). لقد بينت النتائج ان هناك تأثير معنوي للمستخلص على الصفات المذكورة وبمستويات معنوية مختلفة عند مستوى $p < 0.05$.

1- قياس مستوى الكوليسترول الكلي (Total Cholesterol(TC) في مصل الدم

اشارت النتائج الى تاثير معنوي ($P<0.05$) في مستوى الكوليسترول عند معاملة اناث الارانب بمستخلص الالستروجين النباتي. لقد استخدمت الجرعة التصاعدية (0.07، 0.1، 0.2، 0.5، و 0.7) ملغم /كغم من المستخلص لحقن الحيوانات لمدة اربعة اسابيع متتالية. يبين الجدول (1-4) ان الانخفاض في مستوى الكوليسترول كان معنوياً ($P<0.05$) في الاسبوع الثالث مقارنة مع الاسبوع الاخرى (110±6.48)، (99.5±6.31)، و(95.2±7.88).

جدول (1-4) تأثير الجرعة المختلفة من مستخلص الالستروجين النباتي على تركيز الكوليستيرول الكلي (Total Cholesterol(TC) في مصل اناث الارانب المحلية (mg/dl) Cholesterol

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 عمودياً تدل على وجود فروق معنوية بين الفترة الزمنية ضمن المجموعة عند مستوى $p<0.05$ ، الحروف المختلفة الصغيرة أفقياً تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى $p<0.05$.

2- قياس مستوى الشحوم البروتينية عالية الكثافة (HDL) High lipoprotein density في مصل الدم

جدول (2-4) يبين تأثير الجرع المختلفة من المستخلص للاستروجين النباتي على مستوى الشحوم البروتينية عالية الكثافة (HDL) High Density Lipoproteins (HDL) اذ لوحظ زيادة معنوية ($P < 0.05$) لمدة شهر وعلى مستويات مختلفة فيما عدا مجموعة G1 (0.07 mg/kg)، كما لوحظ زيادة معنوية 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.

جدول (2-4) تأثير الجرع المختلفة من مستخلص الاستروجين النباتي على تركيز الشحوم البروتينية العالية الكثافة (HDL) (mg/dl) في مصل اناث الارانب المحلية

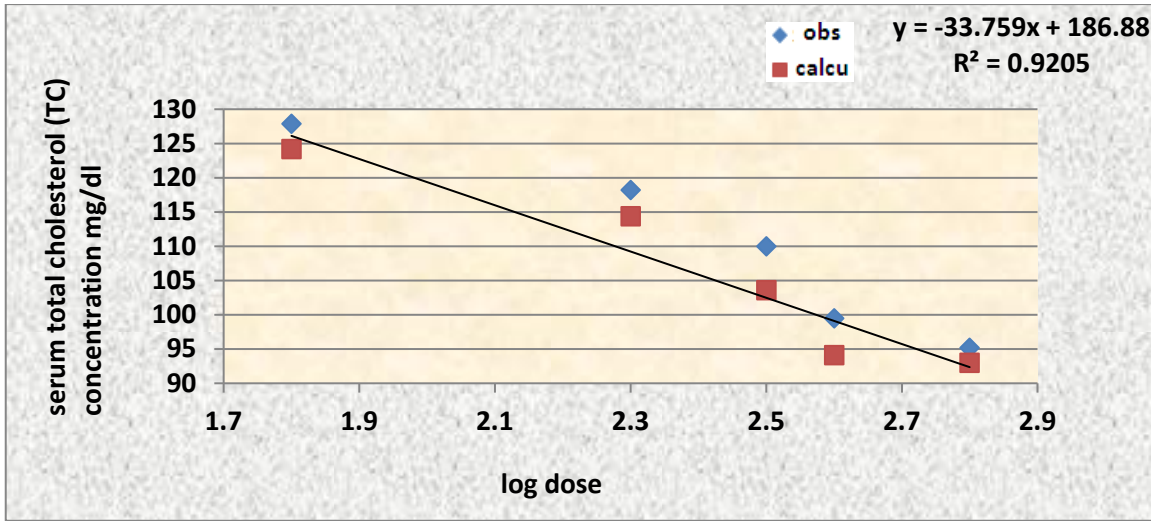
G6 0.7 mg / kg	G5 0.5 mg / kg	G4 0.2 mg / kg	G3 0.1 mg / kg	G2 0.07 mg / kg	G1	المجاميع الفترة الزمنية
51.00 A ± 3.01 a	50.03 A ± 2.75 a	49.66 A ± 3.11 a	50.11 A ± 2.81 a	49.78 A ± 2.11 a	50.60 A ± 2.49 a	الاسبوع الاول
59.00 B ± 2.06 c	57.98 B ± 1.98 c	56.80 B ± 2.90 c	53.91 A ± 2.88 b	51.85 A ± 3.00 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 \pm 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 أفقيا تدل على وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى $p < 0.05$.

1- العلاقة الخطية بين تركيز المستخلص والمعايير الوظيفية لدم الارانب

1-4 تركيز الكوليستيرول الكلي (Total Cholesterol (TC) (mg/dl) بالمصل

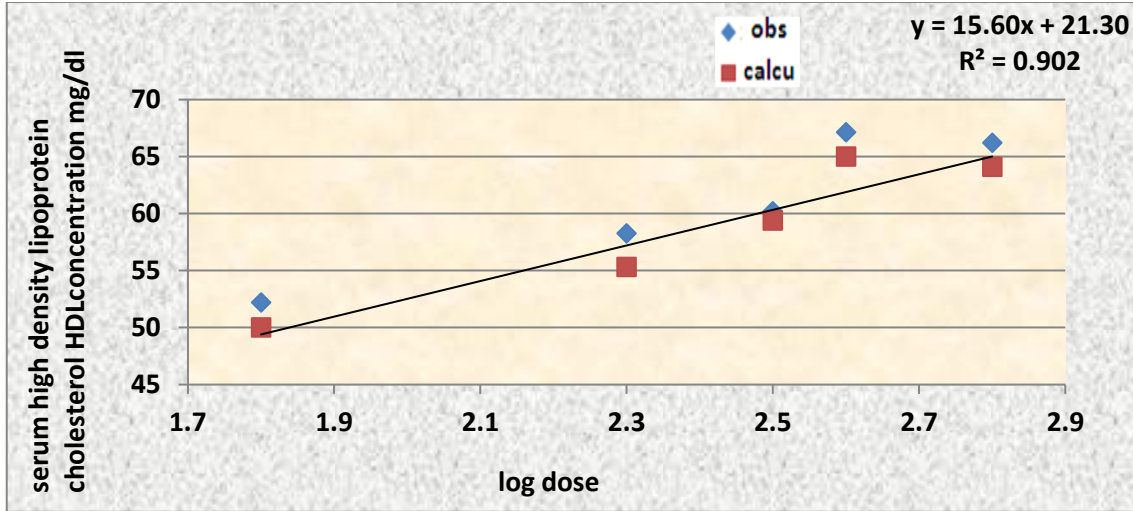
لقد بينت نتائج التجربة الثانية ان تاثير الاستروجين النباتي على الكوليستيرول كان معنوياً في الاسبوع الثالث مقارنة مع الاسبوع الاخرى. لذلك تم اختيار هذه الفترة لدراسة نوع العلاقة بين تركيز الكوليستيرول في دم الارانب وجرعات الاستروجين. يلاحظ من الشكل (1-4) وجود علاقة خطية سالبة بين تركيز الاستروجين ومستوى الكوليستيرول.



شكل (1-4) تأثير الجرعة المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الكوليستيرول الكلي (TC) بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أنثى الارانب البالغة. n=8 لكل مجموعة، $ED_{50} = 0.2\text{mg/kg}$.

2-4 تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة (HDL- High Density Lipoproteins) (mg/dl) بالمصل

من الشكل (2-4) يلاحظ وجود زيادة معنوية في HDL في مصل دم انثى الارانب للجرع المختلفة. وقد لوحظ ان ED_{50} للمستخلص المستخدم في الدراسة الحالية على تركيز HDL بلغت 0.2 mg/kg .



شكل (2-4) تأثير الجرعة المختلفة للاستروجين النباتي على تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL بالمصل بعد ثلاثة اسابيع للمعالجة في أنثى الارانب البالغة. $n=8$ لكل مجموعة $ED_{50}=0.2 \text{ mg/kg}$.

ومن خلال الشكلين (1-4) و (2-4) تم حساب الجرعة للمستخلص والتي بلغت 0.2 ملغم/كغم والتي اعتمدت للتجربة الثالثة للدراسة الحالية.

3-4 التجربة الثالثة Experiment 3

1-3-4 تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي Phytoestrogen في معدل تركيز الهرمونات (الاستروجين E2، هرمون المحفز للجريبات FSH، الهرمون اللوتيني LH)

1-1-3-4 التغيرات في مستوى هرمون الاستروجين E2

يشير الجدول (3-4) 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 و G4 ومجموعة السيطرة G1. كما لوحظ نقص معنوي ($P < 0.05$) لمستوى الاستروجين في مجموعة مزالة المبايض G2 ومجموعة مزالة المبايض والمعالجة G4 في نهاية التجربة مقارنة بقبل المعاملة، بينما لوحظ زيادة معنوية ($P < 0.05$) في

مستوى الاستروجين في المجموعة المعاملة بدون ازالة المبايض (G3) بعد انتهاء مدة المعاملة مقارنة بمستوى الاستروجين قبل المعاملة.

جدول (3-4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز هرمون الاستروجين (µg/ml) لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

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

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 أفقيا 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

2-1-3-4 التغيرات في معدل تركيز هرمون المحفز للجريبات FSH

يلاحظ من الجدول (4-4) وجود ارتفاعا معنويا ($P < 0.05$) في مستوى تركيز FSH (23.67±1.08) في مصل دم الارانب مزالة المبايض (G2) بالمقارنة مع G3، G4، ومجموعة السيطرة G1. بينما اشار الجدول الى وجود انخفاض معنويا في مجموعة G3 و G4 والتي بلغت (18.96±1.03) و (17.08±1.35) وعلى التوالي بالمقارنة مع G2 مجموعة الحيوانات مزالة المبايض.

جدول (4-4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز هرمون محفز الجريبات (µg/ml) FSH لاناث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

G4	G3	G2	G1	المجاميع الفترة الزمنية
A 16.49 ±1.38	A 16.22 ±1.27	A 15.81 ±1.12	A 16.37 ± 1.00	قبل المعالجة
Bd 17.08 ±1.35	Bc 18.96 ±1.03	Bb 23.67 ±1.08	Aa 16.11 ±1.08	بعد 6 شهور

القيم تدل على المعدل \pm 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 أفقيا 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

3-1-3-4 التغيرات في معدل تركيز الهرمون اللوتيني LH

يلاحظ من نتائج الجدول (4-5) ان تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي المستخلص من الفاصوليا الجافة لمجموعة الحيوانات مزالة المبايض والمعالجة G4 ادى الى انخفاضاً معنوياً ($P < 0.05$) في مستوى تركيز LH والذي بلغ (18.61 ± 1.08) بالمقارنة مع مجموعة G2. بينما لوحظ زيادة معنوية ($P < 0.05$) لمجموعة G2 بالمقارنة مع G3 و G4 ومجموعة السيطرة G1. كما يلاحظ من الجدول (4-5) لمجموعة الحيوانات المعالجة بالحقن العضلي للمستخلص ولم تزال المبايض اي فروق معنوية ($P > 0.05$) في مستوى LH بالمقارنة مع مجموعة السيطرة G1 ولكن لوحظ انخفاضاً معنوياً ($P < 0.05$) بالمقارنة مع G2 و G4.

جدول (4-5) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز هرمون تركيز الهرمون اللوتيني LH ($\mu\text{g/ml}$) لاثاث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

G4	G3	G2	G1	المجاميع الفترة الزمنية
A 14.00 ± 1.07	A 13.81 ± 1.31	A 14.01 ± 1.06	A 13.62 ± 1.08	قبل المعالجة
Bd 18.61 ± 1.08	Ba 14.09 ± 1.41	Bb 22.76 ± 1.21	Ba 14.11 ± 1.05	بعد 6 شهور

القيم تدل على المعدل \pm 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 أفقيا 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

4-1-3-4 التغيرات في معدل الكلوتاثاينون المختزل Glutathione Reductase (GSH)

يلاحظ من الجدول (4-6) وجود ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في معدل GSH لمجموعة الحيوانات التي حققت عضليا بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) في مجموعة G3 عند مقارنتها بمجموعة G2 المجموعة المزالة المبايض وكذلك مجموعة السيطرة G1. بينما يلاحظ وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مجموعة الارانب مزالة المبايض G2 بعد 6 شهور من العملية مقارنة بمجموعة 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.

كذلك لم تلاحظ اي فروق معنوية بين المجاميع G2, G3, G4 قبل المعاملة طول التجربة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة G1 للفترة الزمنية قبل المعاملة.

جدول (6-4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل الكلوتاثيون (Mmol/L)GSH لاثاث الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

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

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، Ovariectomized (OVX) تمثل مجموعة المزالة المبايض، G3، Ovariectomized+phytoestrogen تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen

5-1-3-4 Malondialdehyde (MDA) مستوى المالوندايالديهايد

توضح النتائج للجدول (7-4) حدوث ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في مستوى المالوندايالديهايد (MDA) في مجموعة الحيوانات المزالة المبايض G2 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 (7-4) وجود انخفاض معنوي في المجموعة G4 المجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) عند مقارنتها بمجموعة G2 المجموعة المزالة المبايض.

ويشير الجدول (7-4) الى عدم وجود فروق معنوية بين المجاميع G2 و G3 و G4 طول مدة التجربة قبل المعالجة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة G1.

جدول (7-4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل تركيز المألوندايهيد (MDA) (Mmol/dL) لانثا الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

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

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.

4-3-1-6 التغيرات في مستوى ايونات الكالسيوم Calcium Ca في مصل الدم

يشير الجدول (4-8) 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 G1 و G2.

كما لوحظ وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) لمستوى ايونات الكالسيوم للمجموعة المعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للأستروجين النباتي (Phytoestrogen) بعد ازالة المبايض G4 مقارنة بمجموعة G2.

كما وتشير النتائج الى عدم وجود اي فروق معنوية بين المجاميع G4, G3, G2 قبل المعالجة طول مدة التجربة مقارنة بمجموعة السيطرة G1.

جدول (8-4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في مستوى الكالسيوم Calcium (mg/ dl) لانات الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

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

القيم تدل على المعدل \pm 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 G2, Control تمثل مجموعة المزالة المبايض Ovariectomized(OVX), G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض, G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovariectomized+phytoestrogen.

8-1-3-4 التغيرات في معدل الفسفور P phosphorus

تشير نتائج الجدول (4-9) الى وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في معدل الفسفور في مجموعة G2 وهي مجموعة مزالة المبايض بمقارنتها بمجموعة G2 و G4 ومجموعة السيطرة G1. وكذلك يوضح الجدول (4-9) 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)

تدل النتائج الى وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في معدل الفسفور 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 (9-4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في مستوى الفسفور phosphorus (mg/dl) لانات الارانب المزالة وغير مزالة المبايض

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

القيم تدل على المعدل \pm 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 Ovarioectomized (OVX)، G3 تمثل مجموعة المعالجة بدون ازالة المبايض، G4 تمثل مجموعة المزالة المبايض والمعالجة Ovarioectomized+phytoestrogen

7-1-3-4 التغيرات في معدل Alkaline phosphates (ALP)

تشير نتائج الجدول (4-10) 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 (4-10) 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 .

كما وتشير النتائج الى عدم وجود اي فروق معنوية في معدل ALP بين المجاميع G4, G3, G2 قبل المعالجة طول مدة التجربة مقارنة بمجموعة السيطرة G1

جدول (10-4) تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي في معدل Alkaline phosphates (ALP) (U/L) لاثبات 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 \pm 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

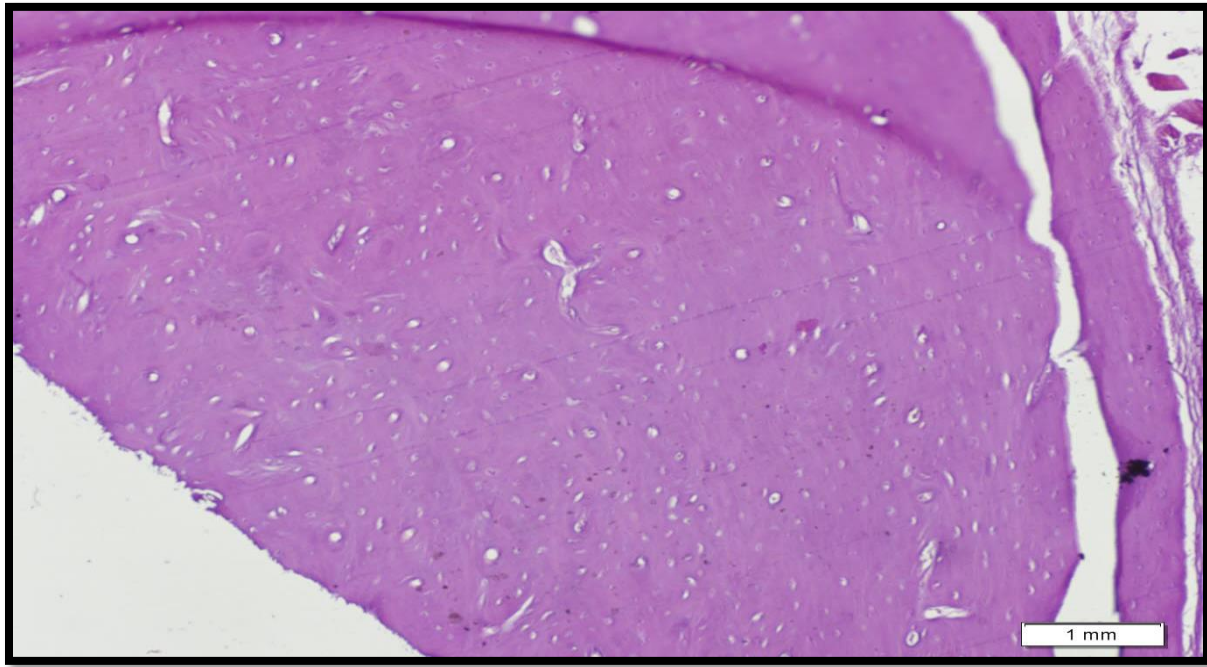
4-4 التغيرات النسيجية Histopathological Changes

4-4-1- تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي

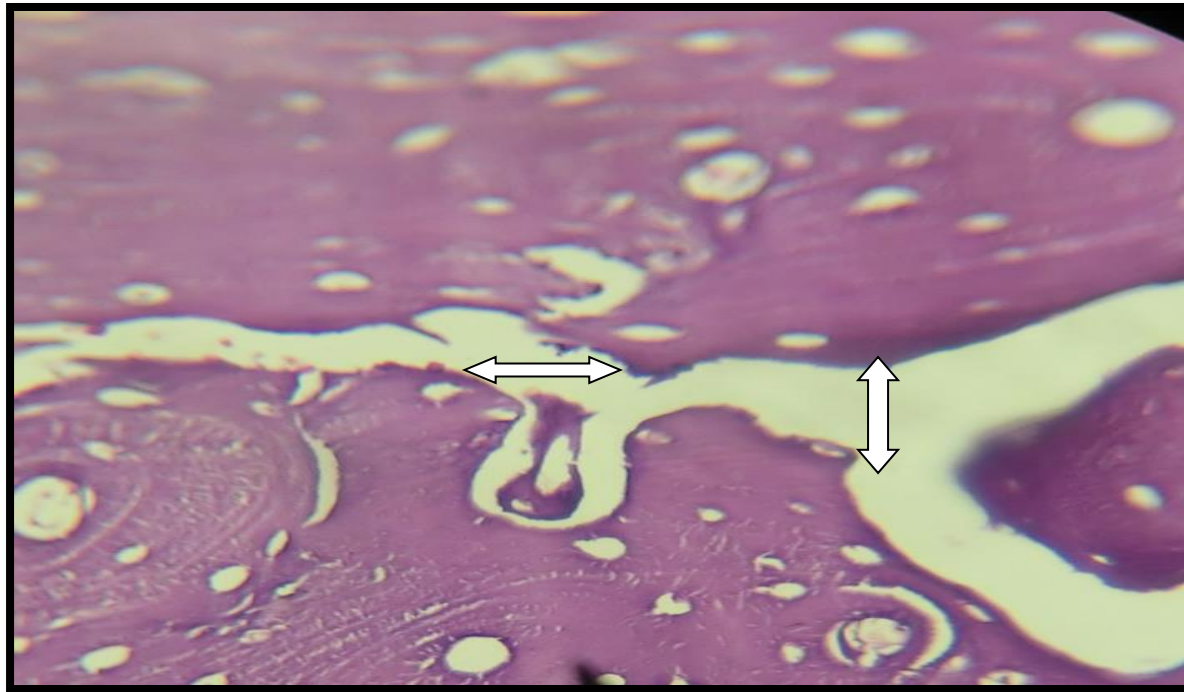
على نسيج العظم

بعد مرور 6 أشهر من ازالة المبايض اخذت مقاطع نسيجية من منطقة الفخذ لوحظت التغيرات المرضية الواضحة على النسيج العظمي وذلك من خلال زيادة في حجم الفجوات lacunae وزيادة الفراغات بين متن العظم، وتطاول في قنوات فولكمان صورة (4-6) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة صورة (4-5). اما مجموعة الحيوانات التي تم حقنها عضليا بـ ED50 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 (4-8) بمقارنتها بمجموعة مزالة المبايض صورة (4-6)

ويلاحظ بمقطع النسيج العظمي مجموعة الارانب المعالجة بدون ازالة المبايض قلة في طول قنوات فولكمان وزيادة كثافة العظم وصغر حجم الفجوات صورة (4-7).

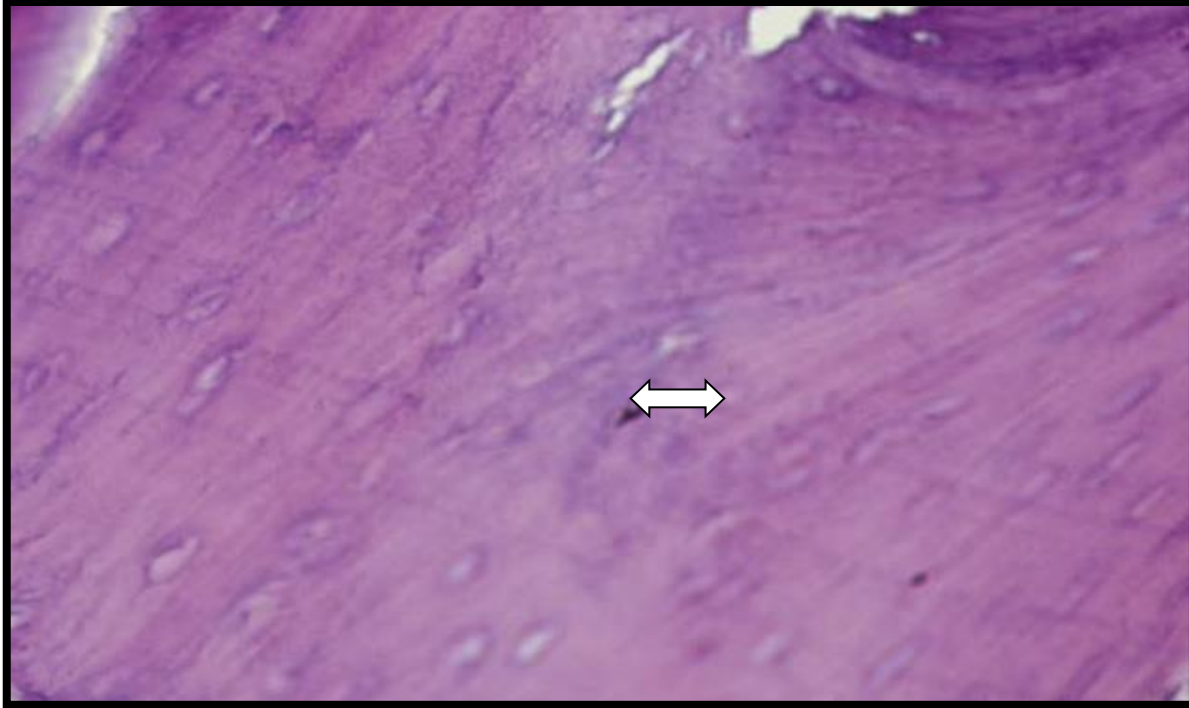


صورة (4-5) مقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة حيوانات السيطرة يلاحظ فيها التركيب الطبيعي

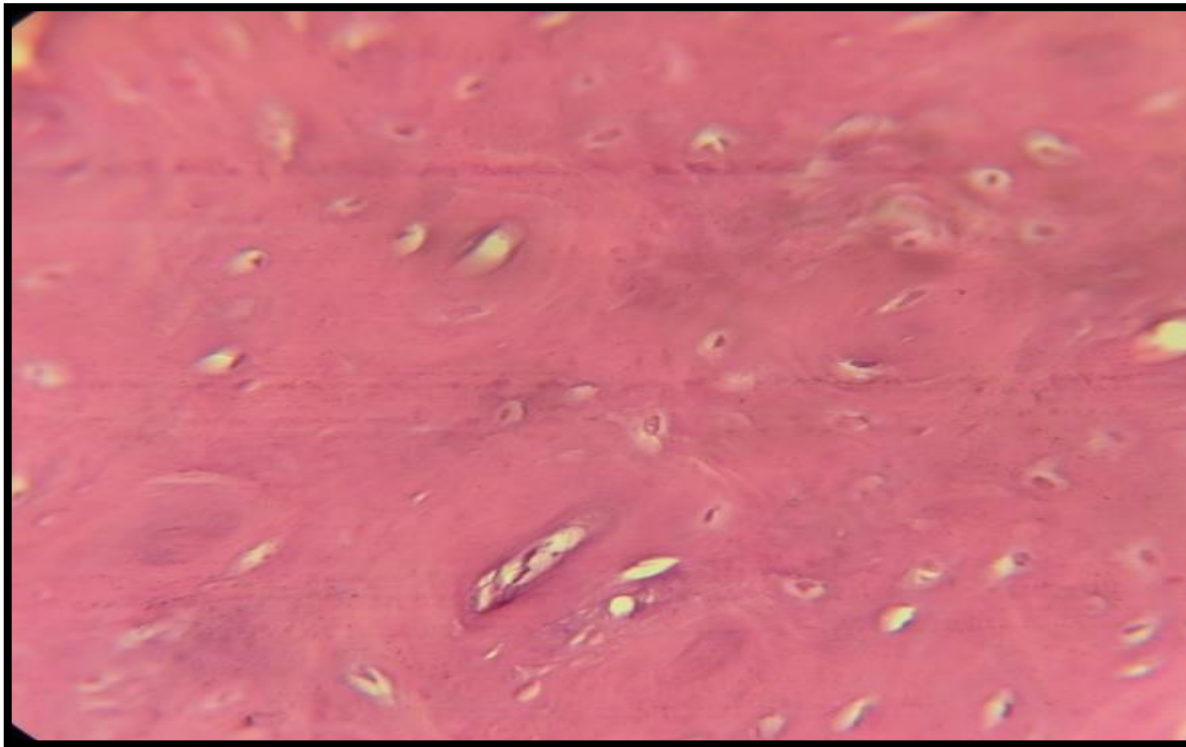


للتسيج (H&E400X)

صورة (4-6) مقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة الحيوانات مزالة المبايض (OVX) يلاحظ فيه الفراغات بين متن العظم وكذلك كبر حجم الفجوات lacunae ووجود الفراغات بالنسيج العظمي (H&E 400X) ↔



صورة (4-7) مقطع نسيجي لعظم الفخذ لحيوانات المعالجة يلاحظ فيها تماسك المادة الاساس وقنوات هافرس ويلاحظ زيادة سمك النسيج العظمي \longleftrightarrow (H&E 400X).



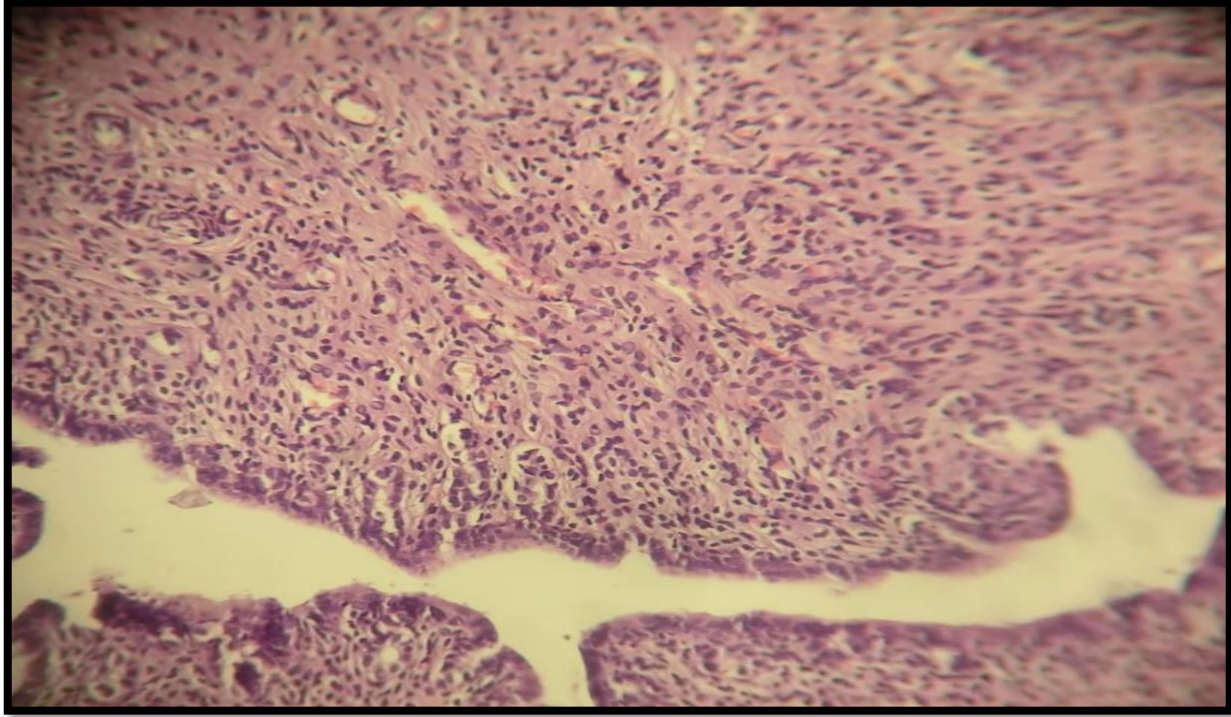
صورة (4-8) مقطع نسيجي لعظم الفخذ لمجموعة الحيوانات المعالجة بعد ازالة المبايض يلاحظ قلة التغيرات النسيجية (H&E 400X).

2-4-4 تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على نسيج الرحم

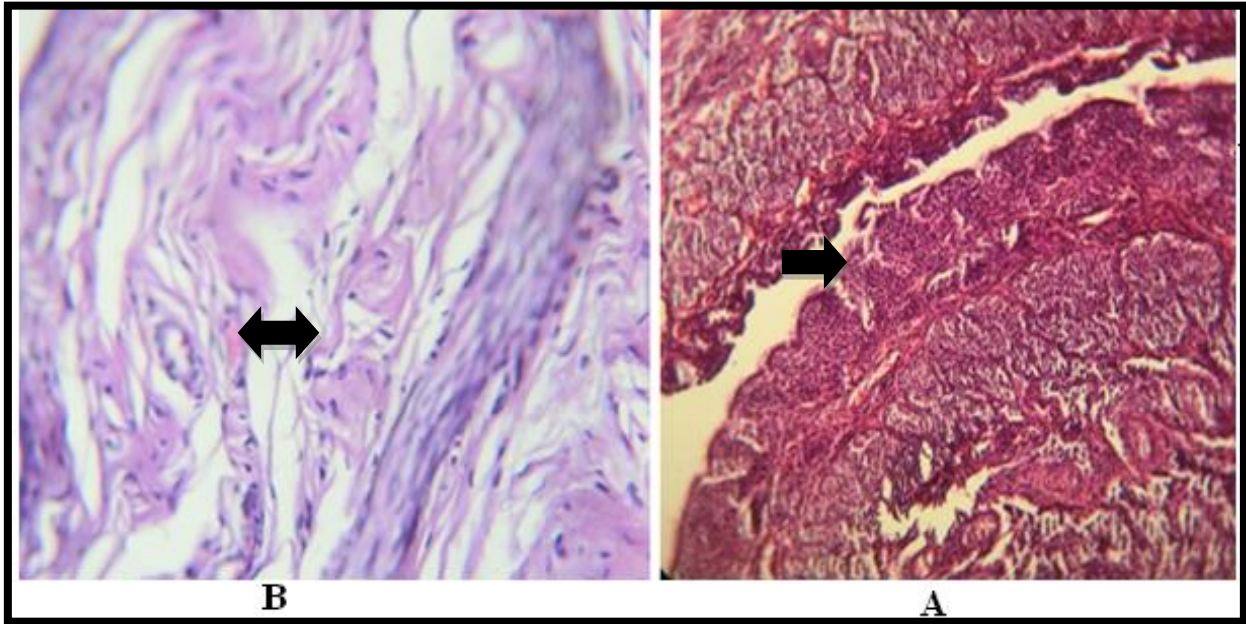
اظهرت نتائج التقطيع النسيجي صورة (10-4) لانسجة الرحم لمجموعة الارانب مزالة المبايض وجود تفكك واضح بالنسيج للطبقات الداخلية للرحم والخلايا غير فعالة وقلّة التغذية الدموية وقلّة عدد الغدد الرحمية مقارنة مع صورة (9-4) وهي المقطع النسيجي الطبيعي لمجموعة السيطرة .

وتظهر الصورة (11-4) النسيج الرحمي لمجموعة الارانب المعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي والتي بلغت (0.2 mg/ kg) والغير مزالة المبايض وجود تغذية دموية عالية بالنسيج وكذلك كثرة عدد الخلايا والغدد الرحمية وفرط نسيج البطانة الرحمية مقارنة مع صورة (10-4) ومجموعة السيطرة (9-4).

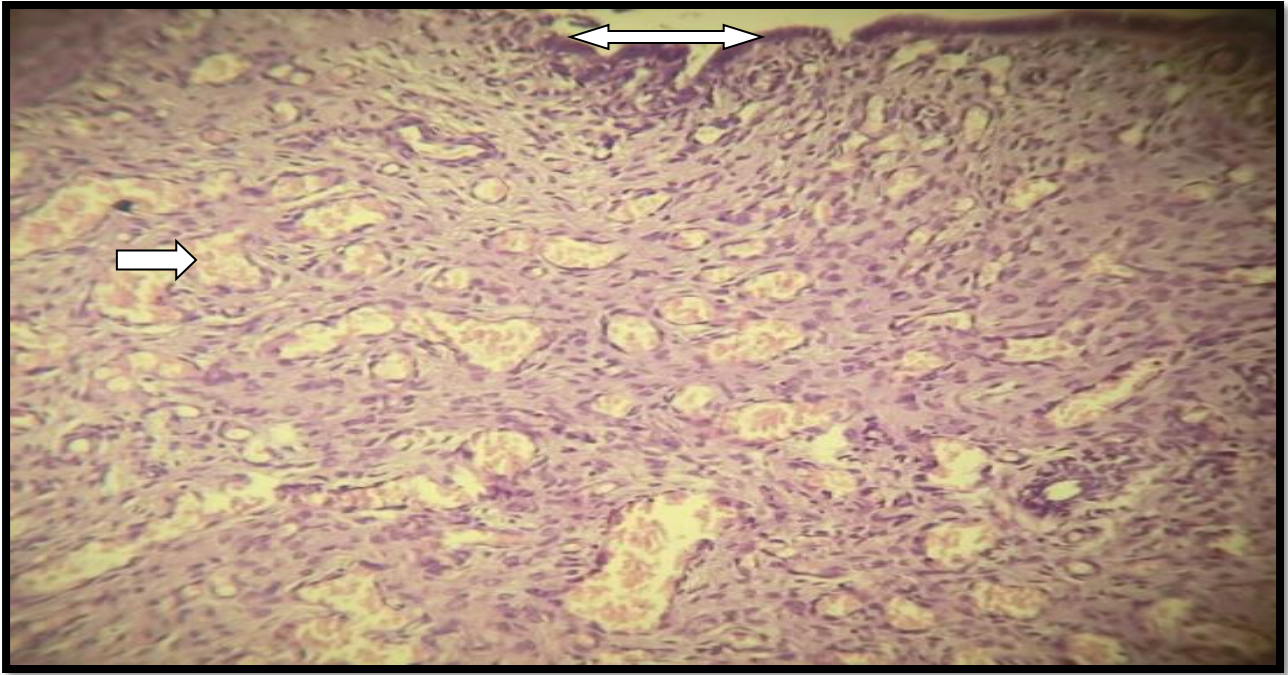
ويبين من خلال التقطيع النسيجي للرحم صورة (12-4) في مجموعة الارانب مزالة المبايض والمعالجة بالحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي حيث يلاحظ قلّة الاوعية الدموية وتحفيز لخلايا البطانة الداخلية للرحم التي تكون غير فعالة ولاوجود لزيادة غير طبيعية بخلايا الرحم مقارنة مع (11-4) المجموعة المعالجة وغير مزالة المبايض ومجموعة السيطرة G1 صورة (9-4).



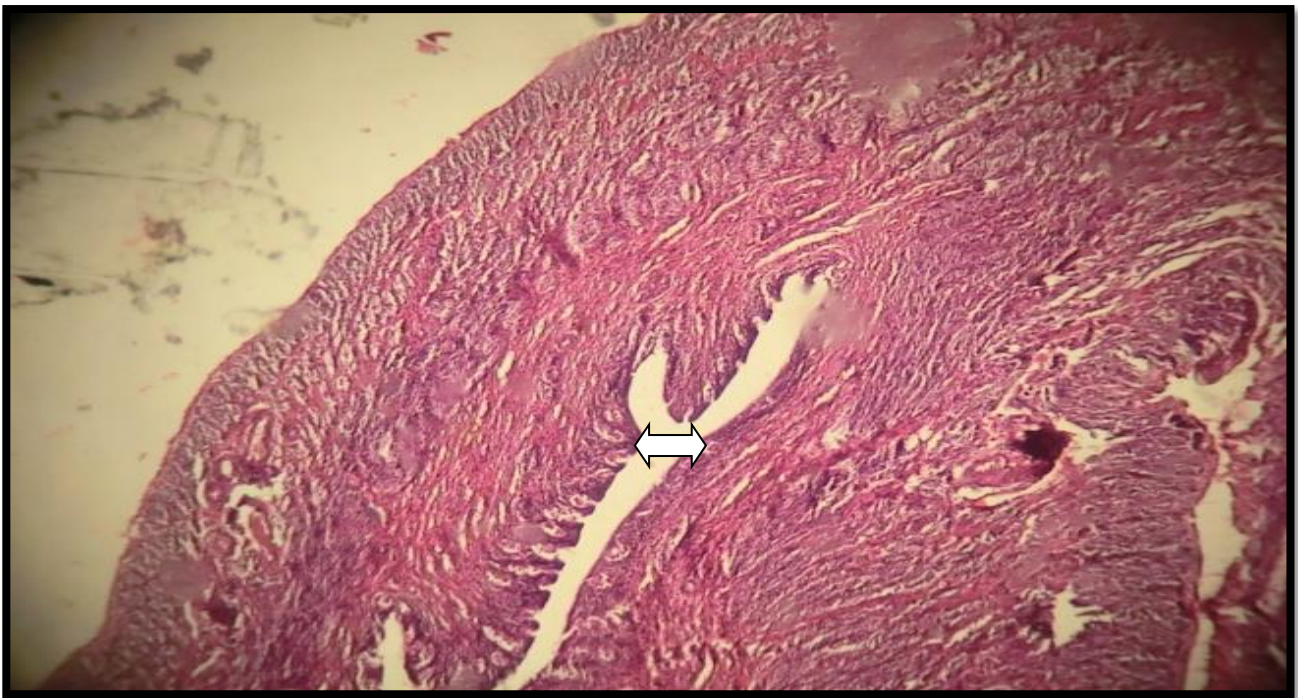
صورة (9-4) مقطع نسيجي لرحم لمجموعة حيوانات السيطرة يلاحظ فيها التركيب الطبيعي للنسيج (H&E400X)



صورة (10-4) مقطع نسيجي للرحم لمجموعة الحيوانات مزالة المبايض (OVX) يلاحظ (A) قلة الاوعية الدموية وخلايا الطبقة الطلانية للرحم غير فعالة → وقلة من عدد الغدد الرحمية. وكما يلاحظ في المقطع B وجود تفكك بالانسجة للطبقات الداخلي للرحم ← (H&E 400 X).



صورة (4-11) مقطع نسيجي للرحم لمجموعة الحيوانات المعالجة بدون ازالة المبايض يلاحظ تغذية دموية عالية مع وجود اعداد كبيرة للغدد الرحمية مع زيادة فرط التنسج لبطانة الرحم (H&E 400 X).



صورة (4-12) مقطع نسيجي للرحم لمجموعة الحيوانات المعالجة بعد ازالة المبايض حيث يلاحظ قلة الاوعية الدموية وخلايا البطانة الرحم تكون غير فعالة (H&E 400X).

5-4 التغيرات الجزيئية

4-5-1- تأثير المستخلص على نشاط الجينات المسؤولة عن إنتاج المادة البينية للعظم

تم استخلاص الحامض النووي RNA من عينات العظام للارانب مزالة المبايض بواسطة طريقة فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وقد استخدم جهاز خاص وهو ال Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) لقياس تركيز الحامض النووي RNA ومدى النقاوة (نسبة البروتين الى الحامض النووي) حيث يبين الجدول ادناه ان الحامض النووي RNA المستخلص كان بنقاوة عالية (1.8-2.0) عند القياس على الطول الموجي 260-280 نانومتر حيث يقيس الطول الموجي 260 نانومتر مستوى الحامض النووي اما الطول 280 نانومتر فانه يقيس مستوى البروتين في العينة وكلما زادت النسبة لتصل الى 2 تعكس زيادة الحامض النووي وقله البروتين بالعينة ،حيث تعتبر هذه العينة عالية النقاوة .ان ارتفاع نقاوة العينة يعكس مدى دقة النتائج المستحصلة في دراسة

النشاط الجيني بتقنية RT-PCR . كما في شكل(4-13)الذي يمثل نتائج استخلاص RNA

RNA -13-4 شكل يمثل نتائج استخلاص RNA

Sample	Total RNA Concentration (ng/ μ L)	RNA Purity (260/280nm)
T1 A	794.0	2.0
T1 B	696.0	1.91
T1 C	665.3	1.90
T1 D	522.2	1.80
T2 A	740.7	1.98
T2 B	695.0	1.90
T2 C	467.6	1.79
T2 D	979.0	2.15
T3 A	628.1	1.84
T3 B	543.3	1.82
T3 C	535.2	1.82
T3 D	536.2	1.78
T4 A	536.0	1.87
T4 B	428.7	1.87
T4 C	503.3	1.89
T4 D	832.9	1.99

4-5-2- استخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الانية (RT-PCR) في قياس مستوى النشاط الجيني بعد المعاملة بالاستروجين

تمت دراسة مستوى النشاط الجيني للجينات المسؤولة عن انتاج المائدة البينية للعظم مثل Col I و Fibronectin اضافة الى دراسة مستقبلات الاستروجين Kappa B في حيوانات التجربة الى مجموعة السيطرة C ومجموعة T1 وهي الحيوانات مزالة المبايض ومجموعة T2 مجموعة الحيوانات المعالجة بدون ازالة المبايض ومجموعة T3 اناث الارانب مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص. لقد تم تقدير كمية الحامض النووي RNA المنتج بعد تأثر ذلك الجين بالمعاملة. ولتقدير كمية الحامض النووي RNA استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الانية او الوقتي RT-PCR. ان المبدأ الاساسي لهذا التفاعل يعتمد على مضاعفة عدد نسخ ال RNA بعد تحويلها الى DNA المقابل cDNA .

فاذا كان الجين نشطا فان كمية ال RNA المنتجة تكون عالية وبالتالي فان جهاز RT-PCR يمكن ان يسجلها بعدد اقل من دورات التفاعل cycle time (CT value) مقارنة بالجين في الحالة غير النشطة. يجب معايرة قيمة CT مع قيم CT للجينات الاخرى ذات النشاط الثابت ولا تتأثر بالمعاملة الحالية مثل جين البيتتا اكتين B-actin والذي يسمى بجين المعايرة House keeping gene .

لقد استخدمت طريقة (Livak Method $2^{-\Delta\Delta CT}$) في حساب التعبير النسبي في نشاط الجينات بعد المعاملة بالاستروجين النباتي (Wang and Hardy, 2004) .

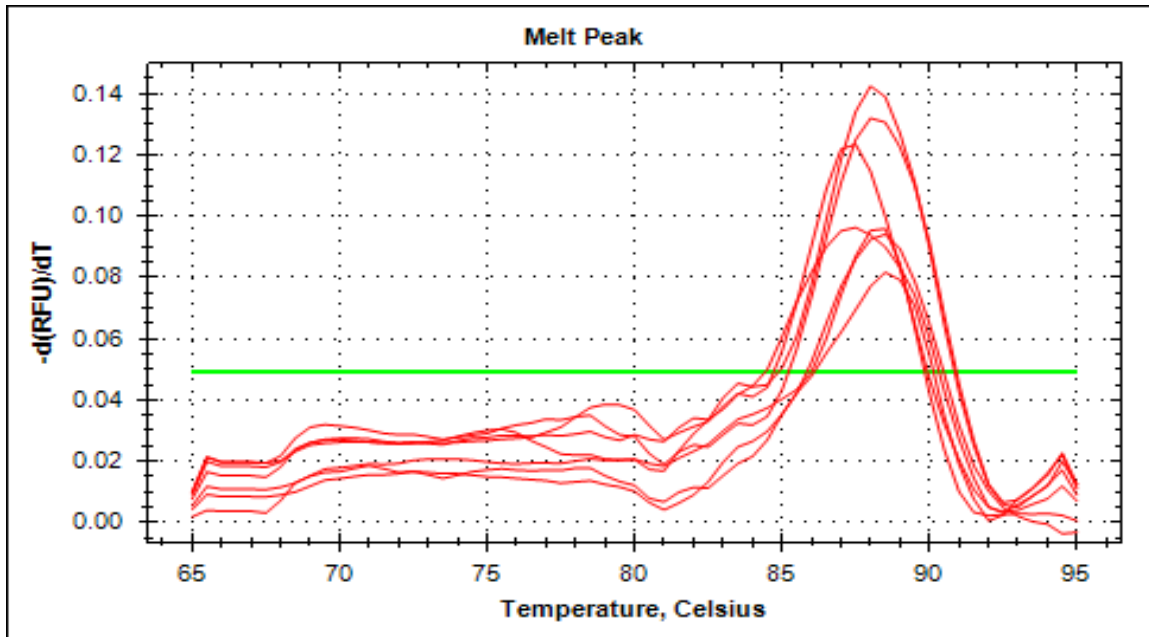
لغرض زيادة دقة التجربة المصممة لقياس مستوى النشاط الجيني بعد المعاملة بالاستروجين النباتي، تم التحقق من تخصص البادئات (primers) المستخدمة في تفاعل سلسلة البلمرة الانية (RT-PCR) باجراء ما يسمى بمنحنى تخصص البادئات (melting curve).

اذا كان لهذا المنحنى قمة واحدة فانه يشير الى وجود تفاعل واحد لمضاعفة نسخ ال cDNA في تفاعل البلمرة. اما اذا كانت اكثر من قمة واحدة فهذا يعني وجود اكثر من تفاعل في سلسلة البلمرة. اي ان البادئات (Primers) غير متخصصة بمضاعفة ال cDNA للجين تحت الدراسة وانما ضاعفت جينات اخرى لاعلاقة لها بالدراسة. في دراستنا الحالية نلاحظ ان كل

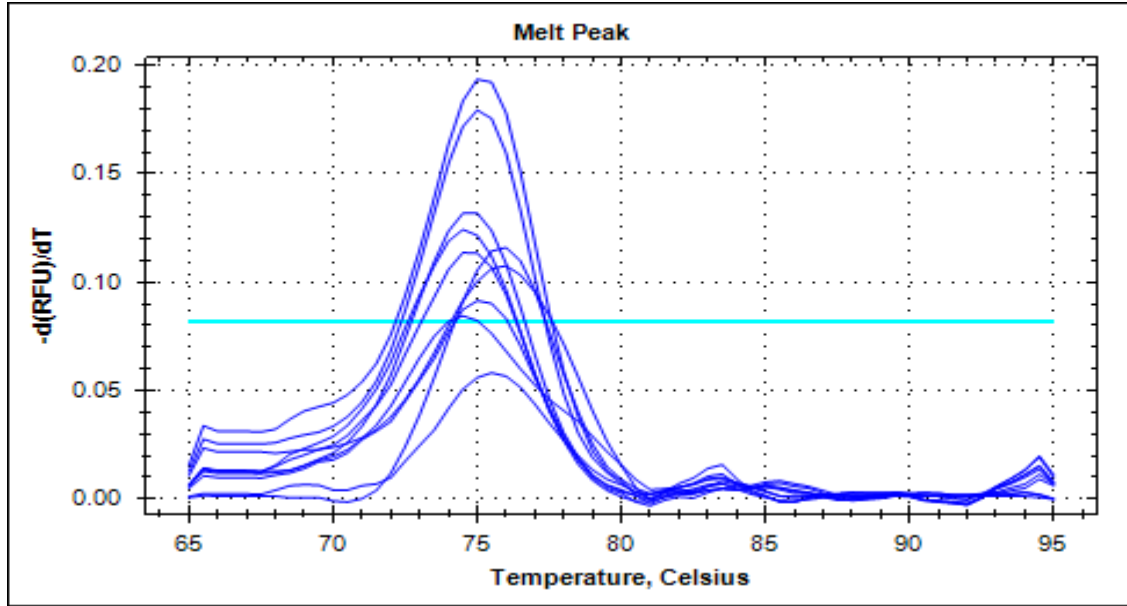
منحنيات تخصص البادئات (melting curve) ذات قمة واحدة شكل (4-4)، (6-4) و (8-4). هذا يشير الى دقة التجربة الحالية وجودة تصميم البادئات (Primers) المستخدمة لقياس النشاط الجيني في سلسلة تفاعل البلمرة الانى RT-PCR .

4-5-3- تأثير المعاملة بالمستخلص النباتي على الكولاجين نوع I

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المعالجة بمستخلص الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) حفزت التعبير الجيني لمستويات الكولاجين نوع I وتبين من النتائج الوراثية ان مستويات الكولاجين نوع I في خلايا البانية للعظم osteoblast ذات زيادة معنوية تعود للمعالجة بالمستخلص النباتي .

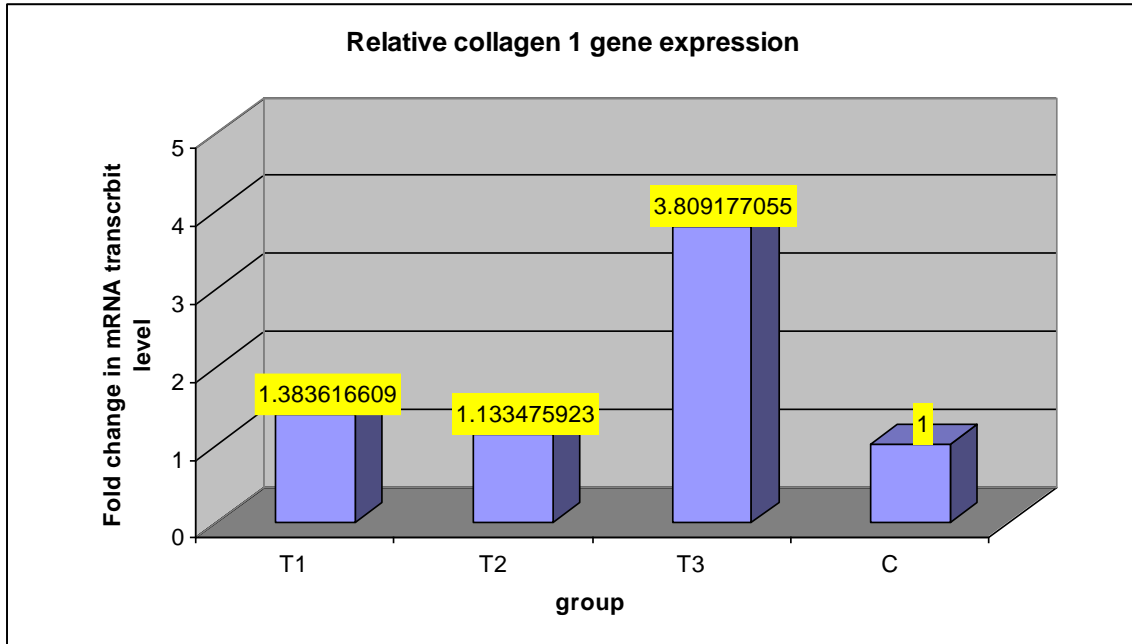


شكل (4-3) يمثل بمنحنى تخصص البادئات (melting curve) جين البيتا اكتين B-actin والذي يسمى بجين المعاييرة



شكل (4-4) يمثل بمنحنى تخصص البادئات (melting curve) لجين الكولاجين I

وقد اظهرت نتائج التعبير الجيني لجين I Collagen type في هذا الدراسة لوجود لفروقات معنوية في مستوى التعبير الجيني للحامض النووي RNA للمجموعة T1 المزالة المبايض (1.38 ± 0.57) ومجموعة T2 المعالجة بدون ازالة المبايض (1.13 ± 0.47) مقارنة الى مجموعة السيطرة. اما بالنسبة للمجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص T3 فقد اظهرت زيادة معنوية (تنظيم مرتفع UP regulation) (3.81 ± 1.28) في التعبير الجيني للكولاجين نوع I collagen type. كما في شكل (4-5).

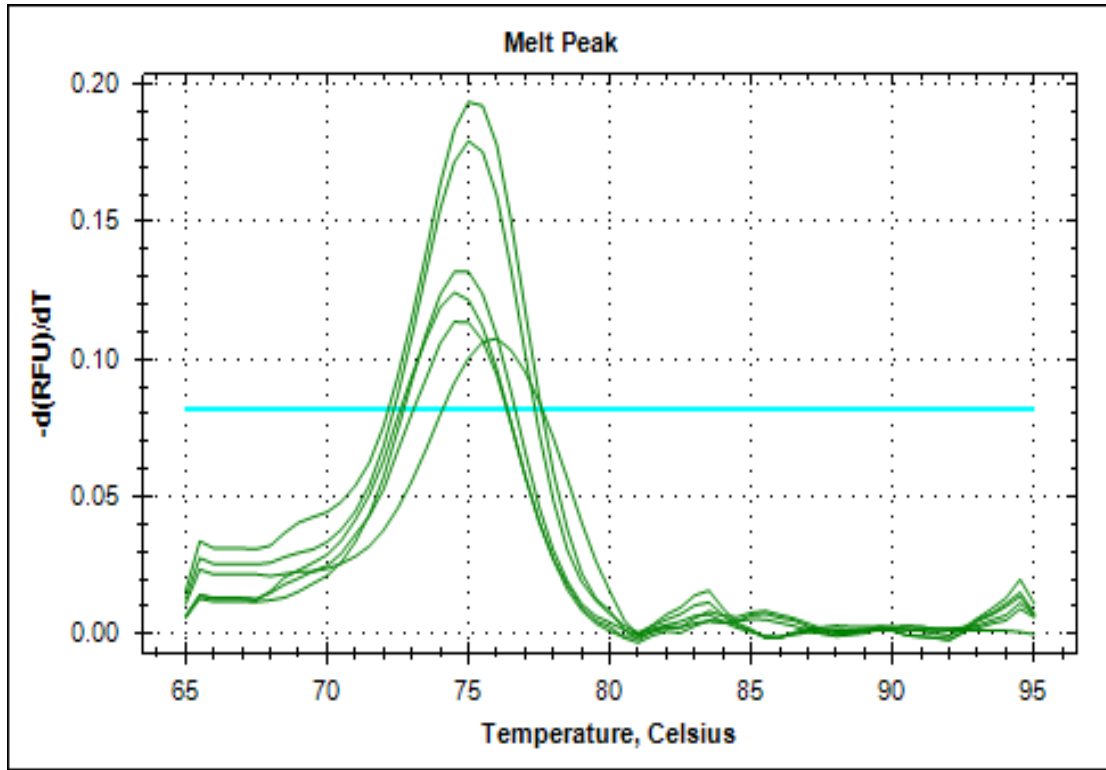


شكل (4-5) يمثل المقياس النسبي للتعبير الجيني للكولاجين الى الجين القياسي B-actin بواسطة قياس . Real time PCR

4-5-4 تأثير المعاملة بالمستخلص النباتي على الفايبرونكتين Fibronecten

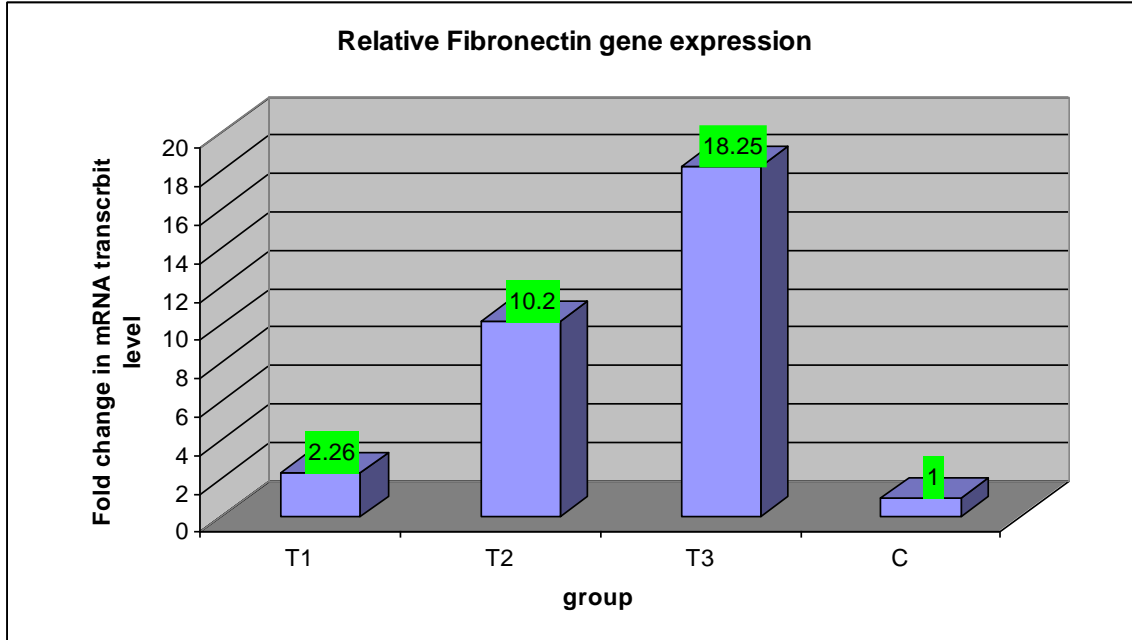
أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المعالجة بمستخلص الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) حفزت التعبير الجيني لمستويات الفايبرونكتين وتبين من النتائج الوراثية ان مستويات الفايبرونكتين في خلايا البانية للعظم osteoblast ذات زيادة معنوية تعود للمعالجة بالمستخلص النباتي .

ونتائج التعبير الجيني للفايبرونكتين طبيعية للجين القياسي لجينات الدراسة B-actin .واوضح منحنى التفكك وجود قمة مفردة لكل PCR التفاعل يشير انه تفاعل PCR ينتج منتج واحد بدون اي تفاعل غير خاص الذي ممكن يرفع نسبة الاخطاء للنتائج النهائية .كما في شكل(3-4) وشكل(4-6)



شكل (4-6) يمثل بمنحنى تخصص البادئات (melting curve) لجين الفايبرونكتين

وقد اظهرت نتائج التعبير الجيني لجين الفايبرونكتين في هذا الدراسة لوجود لفروقات معنوية في مستوى التعبير الجيني للحامض النووي RNA للمجموعة G2 المزالة المبايض (2.26 ± 1.17) ومجموعة G3 المعالجة بدون ازالة المبايض (10.2 ± 5.59) مقارنة الى مجموعة السيطرة. اما بالنسبة للمجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص G4 فقد اظهرت زيادة معنوية (تنظيم مرتفع regulation UP) (18.25 ± 7.55) في التعبير الجيني للفايبرونكتين fibronectin . كما في شكل (4-7)

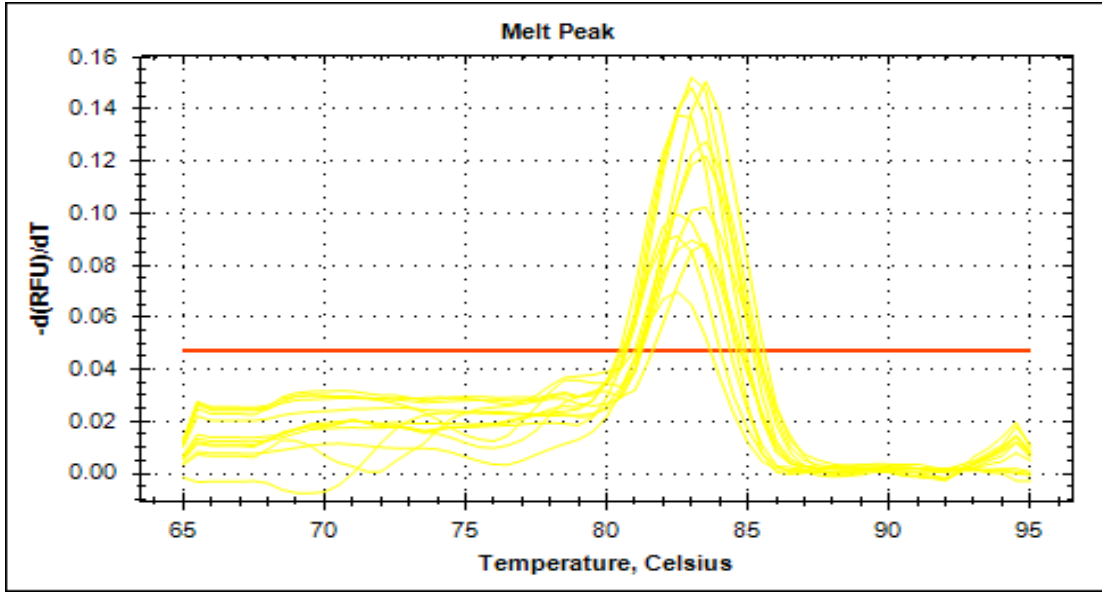


1

شكل (4-7) يمثل المقياس النسبي للتعبير الجيني للفايبرونكتين الى الجين القياسي B-actin بواسطة قياس Real time PCR .

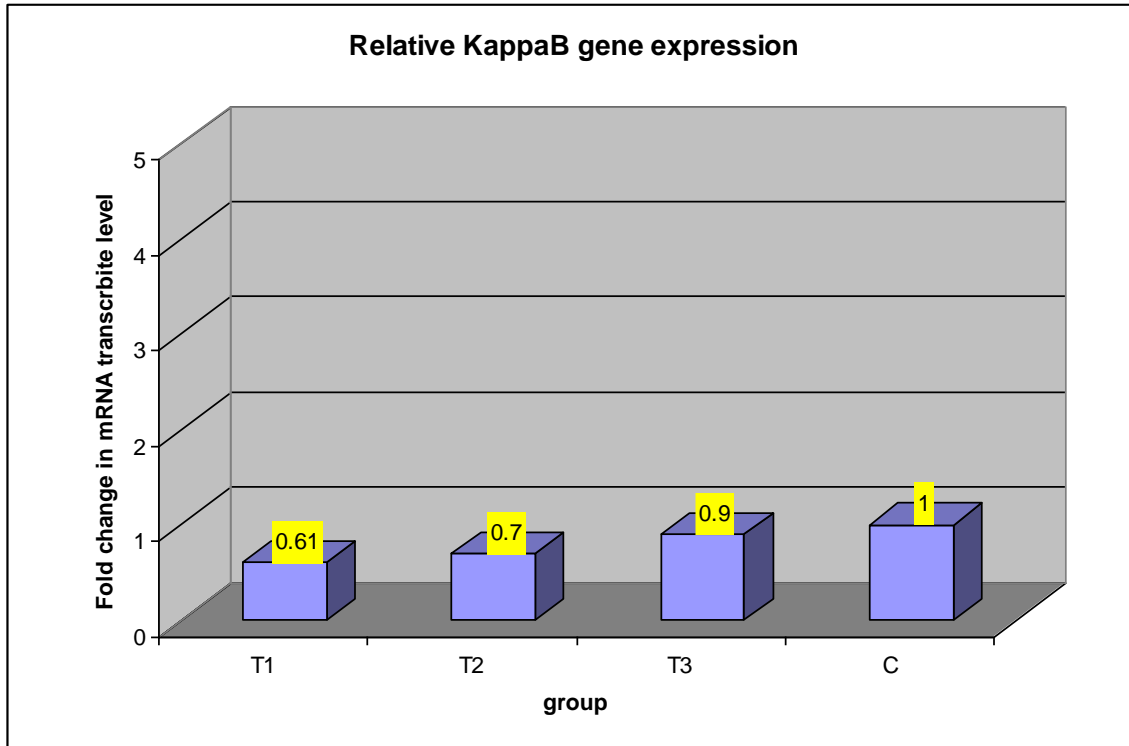
5-5-4 تأثير المعاملة بالمستخلص النباتي على Kappa B

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المعالجة بمستخلص الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) حفزت التعبير الجيني لمستويات Kappa B وتبين من النتائج ان مستويات Kappa B في النسيج العظمي ذات زيادة معنوية تعود للمعالجة بالمستخلص النباتي .



شكل (4-8) يمثل بمنحنى تخصص البادئات (melting curve) لجين Kappa-B

وقد اظهرت نتائج التعبير الجيني لجين Kappa B في هذا الدراسة لوجود لفروقات معنوية في مستوى التعبير الجيني للحامض النووي RNA للمجموعة G2 المزالة المبايض (0.61 ± 0.18) ومجموعة G3 المعالجة بدون ازالة المبايض (0.7 ± 0.17) مقارنة الى مجموعة السيطرة. اما بالنسبة للمجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص G4 فقد اظهرت زيادة غير معنوية (0.9 ± 0.52) في التعبير الجيني للكولاجين نوع Kappa B. كما في الشكل (4-9)



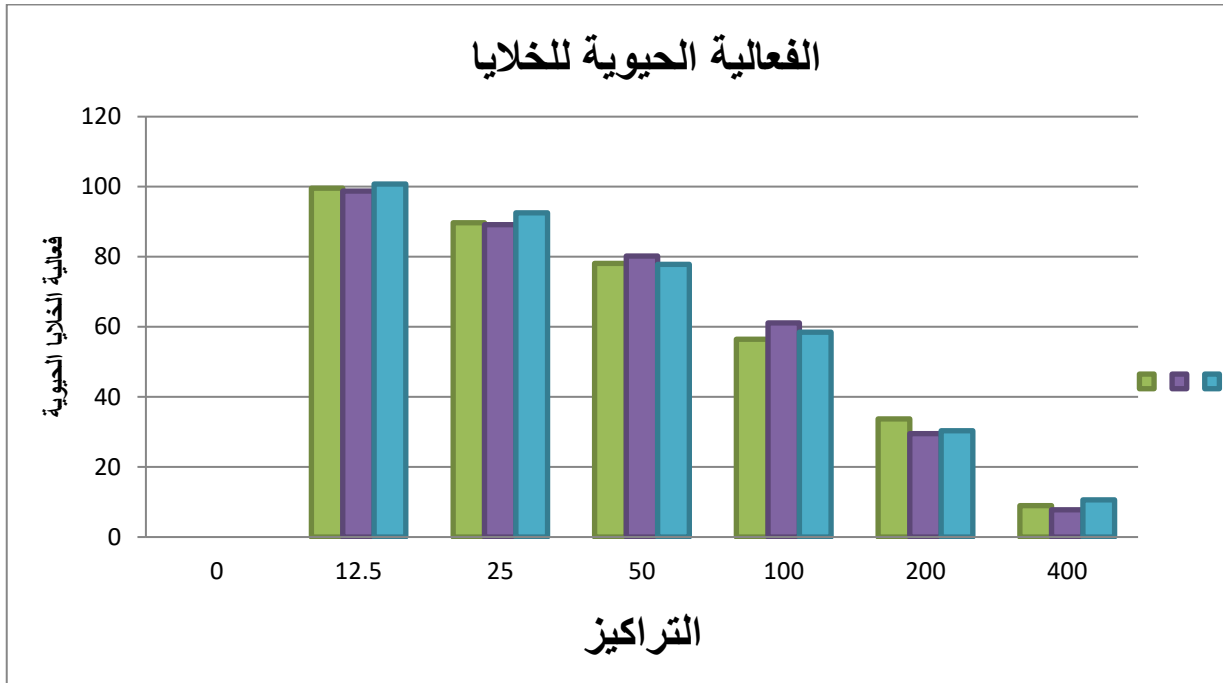
شكل (4-9) يمثل المقياس النسبي للتعبير الجيني Kappa B الى الجين القياسي B-actin بواسطة قياس Real time PCR .

4-5-6 دراسة الفعالية الحيوية لخلايا العظم بعد المعاملة بالاستروجين النباتي

قبل 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 بتركيز تصاعدي (12.5 إلى 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 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 (4-10) يبين الفعالية الحيوية للخلايا المعاملة بمستخلص الاستروجين النباتي

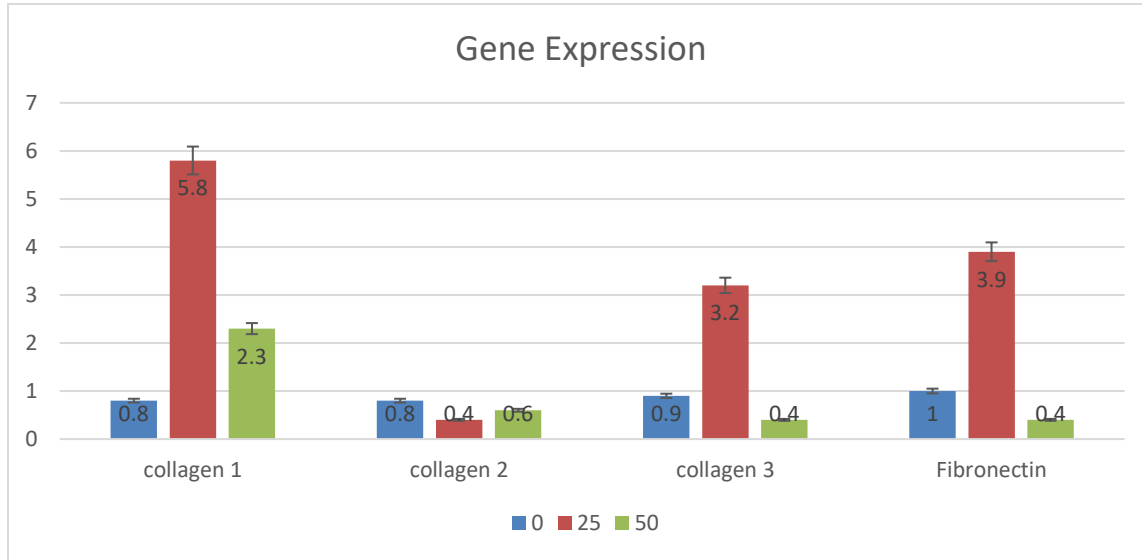
7-5-4 تأثير الاستروجين النباتي على النشاط الجيني لجينات الكولاجين والفايبرونكتين في الخلايا العظمية

استخدمت خلايا العظم Osteoblast لدراسة تأثير الاستروجين النباتي على فعالية جينات الكولاجين نوع I والفايبرونكتين في بادئ الامر تم معاملة الخلايا بتركيز واطى (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 50 مايكروغرام /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(4-11) التعبير الجيني لجينات الكولاجين والفايبرونكتين

الفصل الخامس
المناقشة

Discussion

1-5 تأثير الحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي Phytoestrogen في معدل تركيز الهرمونات (الاستروجين E2، هرمون المحفز للجريبات FSH، الهرمون اللوتيني LH)

أشارت الدراسة الحالية ان استخدام 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 (4-5) 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 وتنفق هذه النتائج مع (Yung,2001 ; Edward *et al*, 2001 ; Hamed *et al* , 2010) .
 ينخفض 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 الغدة النخامية والمبيض لانتاج الهرمونات الستيرويدية (Eijken *et al*, 2007; العلوجي، 2005).
 وفي حالة ازالة المبايض جراحيا عند النساء وهي المصدر الرئيسي للاستروجين يتراجع الهرمون لتظهر اعراض سن الياس (Johnson *et al*, 1997; Chua *et al*, 2011).

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 Steroids ولكنها تفقد القدرة على بناء وتصنيع C19 Precursors الاولي او البدائي وانما تعتمد على C19 Steroids الدائر لتصنيع الاستروجين (Sasano *et al* , 1997; Simpson *et al* , 1999)

كما اشارت عدد من الدراسات 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 (Asuncion et al, 2000; Lane et al ,2006).

اشارت النتائج ارتفاع مستوى الاستروجين وتحسن معدله في مصل الدم لمجموعة الارانب مزالة المبايض والمعالجة بالجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي, وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Haidong et al,2011) والذي استخدم مستخلص عشبة مائية على اناث الجرذان مزالة المبايض و (Hamed et al.,2010) والذي استخدم بدراسته بروتينات فول الصويا المجرعة لاناث الارانب مزالة المبايض حيث ارتفع مستوى الهرمون بعد العلاج . اتفقت نتائج الدراسة في الجداول (6-4) و(7-4) التي بينت تاثير الاستروجين النباتي على مستوى هرمون الاستروجين وهرموني FSH و LH مع عدة دراسات (السعدي، 2012؛ Korhonen et al,2001; Simpson et al ,1999) حول ارتفاع معدل تركيز هرموني FSH و LH في مجموعة الارانب مزالة المبايض حيث ينخفض هرمون الاستروجين بهذه المجموعة وبصورة كبيرة مما ينتج عنه زيادة في مستوى الهرمون اللوتيني LH فقد يكون السبب عن طريق التغذية الاسترجاعية بين هرمونات الغدة النخامية والمبيض لإنتاج الهرمونات الستيرويدية أما هرمون FSH فيرتفع أيضا بسبب الهبوط الحاد في الهرمون المثبط Inhibin .

قد يعزى سبب ارتفاع مستوى هرمون FSH وذلك بسبب الهبوط الحاد في الهرمون المثبط Inhibin والذي يقل ويختزل مع تقدم العمر مما يؤدي الى تحرير FSH بكمية كبيرة لمصطلح الدم (Vale et al ,2004; Reame et al, 2007 ; Zaid et al 2009) . وتتفق النتائج مع (Karamifar et al ,2005) لزيادة مستوى هرموني FSH و LH في مجموعة مزالة المبايض والذي قد يكون السبب لمهاجمة الجذور الحرة لانسجة المبايض وتحطيم الحويصلات المبيضية في المبيض.

اظهرت النتائج حدوث انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في معدل الهرمون المحفز للجريبات FSH والهرمون اللوتيني LH بعد اعطاء الحيوانات الجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) بالحقن العضلي في مجموعة الحيوانات مزالة المبايض وتتفق هذه النتائج مع ((Petill *et al*, 1995; Moran *et al*, 2005)) وذلك العامل الانتقالي وهو Inibin الذي يثبط ارتفاع هرمونات LH و FSH . ان للاستروجين دور مهم كمضاد اكسدة Antioxidant كايح للجذور الحرة Scavenger of free radical (Bulkley, 1983; Gomez *et al*; 2000; Maggio *et al*, 2003). يستخدم الاستروجين النباتي كعلاج بديل عن الاستروجين الصناعي وذلك لتجنب التأثيرات الجانبية (Hammond, 1994).

سجلت الابحاث فائدة العلاج البديل بالاستروجين والذي يحسن وظائف الذاكرة ووظائف الدماغ في الجرذان مزالة المبايض (Gibbs, 2000) وكذلك فائدته في علاج اضطرابات النساء في سن مابعد اليأس (Resncik *et al*, 1997).

اشارت الابحاث للعلاجات البديلة و الاستروجين النباتي يعتبر واحد من اقوى العلاجات البديلة والذي يكون ليس له تاثيرات جانبية سيئة كما في العلاجات البديلة الصناعية (Perera *et al*, 2002; Duffy *et al*, 2003). ولاتتفق النتائج لتأثير العلاج على انخفاض مستوى هرموني LH,FSH مع دراسة (Wilcox *et al*, 1990; Yazigi *et al*, 2002).

1-1-5 التغيرات في معدل الكلوتاثاين المختزل Glutathione Reductase (GSH)

يلاحظ من الجدول (4-8) وجود ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في معدل GSH لمجموعة الحيوانات التي حقنت عضليا بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) في مجموعة G3 عند مقارنتها بمجموعة G2 المجموعة المزالة المبايض وكذلك مجموعة السيطرة G1. بينما يلاحظ وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مجموعة الارانب مزالة المبايض G2 بعد 6 شهور من العملية مقارنة بمجموعة السيطرة G1.

2-1-5 التغيرات في مستوى المألوندايالديهيد (MDA)

توضح النتائج للجدول (4-9) حدوث ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في مستوى المألوندايالديهيد (MDA) في مجموعة الحيوانات المزالة المبايض G2 مقارنة بمجموعة G3 و G4 ومجموعة السيطرة G1.

كما 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 .

اشارت الدراسة الحالية ان عملية ازالة المبايض تؤدي الى انخفاض معنوي في مستوى تركيز هرمون الاستروجين والتي اتفقت مع (Scandalios, 2005; Weitzman and Pacifici, 2006) وبالتالي زيادة في حالة الاجهاد التاكسدي 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 .

قد لوحظ في الدراسة الحالية انخفاضا معنويا في مستوى GSH وارتفاعا معنويا في مستوى MDA في مجموعة الارانب مزالة المبايض (Tian *et al*, 1991; Higuchi, 2004).

والنتائج متفقة مع (Wohaieb *et al*, 1994 Basu *et al*, 2001) 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 التاكسد .

وفي دراسـات اخـرى أوجـد كـل مـن (Maggio *et al* 2003; Jovanovica *et al* 2004 Buencamino *et al*, 2009) ان مضادات الاكسدة وبضمنها مستويات GSH منخفضة في المرضى المصابين بهشاشة العظام Osteoprosis ووجدوا 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.

اشارت بعض الدراسات ان زيادة مستوى MDA في مصل دم الحيوانات مزالة المبايض كنتيجة ل Lipid Peroxidation في الاناث مزالة المبايض التي استحث بها هشاشة العظام Osteoprosis مقارنة بمجاميع السيطرة)، (Mabuchi ,1996; Townsend et al ,2003;Halliwell et al ,2007).

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 (Chaudiere & Ferrari ,1999).

يعتبر الاستروجين النباتي لمحتواه الفينولي والفلافونديينات Flavonoids ذو فعالية علاجية جيدة فهو يعالج للكثير من الالتهابات مثل كونه مضاد للالتهاب ومضاد للاكسدة وكذلك لفعاليته المضادة للسرطان (Norhaiza et al , 2009; Karim et at ,2011 ;Fazliana et al ,2011).

ان انخفاض مستوى هرمون الاستروجين في مجموعة مزالة المبايض يزيد من توليد الجذور الحرة الاوكسجينية وانواع الاوكسجين الفعالة (ROS) Reactive Oxygen Species 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 الخلية (Yen et al ,1999; Tug et al ,2006;Michael ,2007;) كذلك ارتفاع مستوى MDA في مصل الارانب المزالة المبايض يساهم في توليد الجذور الحرة وبالتالي يقل قدرة النظام للتخلص منها وازالتها ويؤدي الى التقليل من مستويات GSH

وهذه النتيجة متفق مع دراسة التي تشير الى التعاقب الذي يحصل في حالة مضادات الاكسدة لمختلف الانسجة كنتيجة للزيادة في Lipid Peroxidation لهذه الانسجة بعد حث حالة الاجهاد التاكسدي الحاصل لها كما في حالة ازالة المبايض الحاصلة وبالتالي انخفاض هرمون الاستروجين الذي يعتبر كمضاد للاكسدة (Khudiar, 2000 ; AL -Zubaidi ,2007) .

يلاحظ بالنتائج ارتفاع في مستوى GSH وانخفاض مستوى MAD للمجموعة المعالجة بالجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي بعد ازالة المبايض لها وتتفق هذه النتيجة مع (Kamsiah *et al* ,2006;Young and Woodside , 2001) في مصل والذي يكبح عمل lipid Peroxidation بعد العلاج بالاستروجين النباتي .

يرتفع مستوى GSH في الحيوانات بعد المعالجة بالجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي (Phytoestrogen) المجموعة المزالة المبايض والمعالجة بالاستروجين النباتي G4 وكذلك مجموعة G3 المعالجة بالاستروجين دون ازالة المبايض هذه النتائج مع (Dang ,2009 ;Zhao , 2011) حيث يكون للاستروجين النباتي فعالية مضاد اكسدة Antioxidant وفي حالة العلاج به يرتفع مستوى GSH لتأثير الاستروجين العلاج بزيادة الاستروجين فتزداد مضادات الاكسدة في مصل الدم ، وفائدته بتعزيز مضادات التاكسد وزيادة GSH .

يلاحظ انخفاض MDA بعد المعالجة بالاستروجين النباتي (G2) Phytoestrogen وكذلك ملاحظة انخفاض مستوى MDA في المجموعة G4 المزالة المبايض والمعالجة بالاستروجين النباتي Phytoestrogen وهذه النتيجة تتفق مع (Kamsiah *et al* ,2004;Hamed *et al* ,2010) حيث انخفض مستوى MDA للجرذان مزالة المبايض بعد اعطاء العلاج الذي يحتوي على الاستروجين النباتي Pytoestrogen وهو زيت الصويا Soya Oil . والملاحظ في دراستنا الحالية ايضا لما للتأثير الايجابي للاستروجين النباتي Phytoestrogen على زيادة GSH بعد العلاج للارانب مزالة المبايض وكذلك للمعالجة بدون ازالة المبايض وذلك لدوره في زيادة المؤكسدات التي قلت بازالة المبايض وكذلك لدوره الفاعل بانخفاض مستوى MDA بعد

فترة المعالجة للارانب مزالة المبايض وكذلك المعالجة بدون عملية الازالة
(Gambhir & Jain ,1997)

3-1-5 التغيرات في مستوى ايونات الكالسيوم Calcium Ca في مصل الدم

يشير الجدول (4-10) 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 إزالة المبايض G4 مقارنة بمجموعة G2 .

ان الارتفاع المعنوي في مستوى ايونات الكالسيوم في مصل دم اناث الارانب مزالة المبايض للدراسة الحالية جاءت متفقة مع (Batlle ,1996; Bourrin *et al* , 2002; Kim *et al* 2006) بالاضافة الى الزيادة لنشاط خلايا ناقضة العظم Osteoclast وزيادة عدد الناضجة منها Mature Osteoclast وزيادة تحرير الكالسيوم والفوسفات Phosphate وكذلك البيبتيدات Peptides مع المادة الاساس للعظم Matrix. قد يعود سبب الزيادة في مستوى الكالسيوم في مصل الدم الى الزيادة في الاجهاد التأكسدي والذي لوحظ في الدراسة الحالية ان انخفاض مستوى الاستروجين ادى الى الزيادة في مستوى MDA والانخفاض في مستوى GSH اي عدم التوازن بين المؤكسدات ومضادات الاكسدة وبالتالي حصول التحطم الخلوي وحصول تنخر بالعظم (Muthusami *et al*,2005 ;Scandalios,2005;Sanchez *et al.*,2007) .

ان حصول حالة الاجهاد التأكسدي والنتيجة 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 (Canalis *et al* ,2007). ان التدهور في متانة العظم ناتج من الزيادة في اعداد الخلايا

الناقضة للعظم والتي تؤدي الى الزيادة في ادمصاص مادة العظم (Goss *et al.*,2004) وتتفق الدراسة الى العديد من الدراسات بوجود علاقة وثيقة بين نقص هرمون الاستروجين وزيادة نشاط الخلايا الناقضة للعظم (Roodman,1996; Gross *et al.*,2004) .

ان هشاشة العظام هو من اكثر امراض العظام الايضية انتشارا والنتيجة 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 (Potu *et al.*2009 ;Hidaka *et al.*,2006) .

وفي حالة زيادة الكالسيوم في المجموعة المزلة المبايض يزداد ادمصاص العظم Bone Resorption بتحفيز فعل خلية ناقضة العظم Osteoclast ويؤدي للاصابة بمرض هشاشة العظام (Iwamoto *et al* ,2003;Turner *et al* , 2002 ; Castaneda *et al*,2008;).

لقد اشارت بحوث اخرى الى وجود علاقة بين زيادة نشاط الخلية الناقضة للعظم وزيادة نسبة الدهون في مصل الدم للحيوانات مزلة المبايض او في سن اليأس (Maggio *et al*,2003 ;Manologas,2000) . كما لوحظ اكسدة الدهون وانخفاض في كتلة العظم (Basu *et al*,2001; Sontakke &Tare,2002) . وان زيادة الاجهاد التأكسدي يكون عامل خطورة للاصابة بمرض هشاشة العظام Osteoporosis (Muthusami *et al*,2005) .

تتفق نتائج الدراسة بزيادة مستوى الكالسيوم في المجموعة مزلة المبايض مع دراسات اخرى (Kanis *et al* ,2006 ;Haidong *et al* ,2011) والتي اعزت زيادة الكالسيوم لتأثير ازالة المبايض على الامعاء مما يسبب قلة تحسسها لفيتامين D وكذلك قلة اعادة الامتصاص الكالسيوم في النبيبات الكلوية مما يؤدي الى زيادة افراز الكالسيوم بالادرار فيزداد مستواه وكل هذه العوامل تؤدي الى تنشيط فقدان العظم Bone loss وبالتالي الاصابة بمرض هشاشة العظام Osteoporosis

تشير البحوث ان ارتباط هرمون الاستروجين بمستقبلات β تؤدي الى الزيادة في تمايز خلايا بانية العظم osteoblast وبالنتيجة زيادة واضحة في فعالية خلايا ناقضة العظم osteoclast والمستوى الطبيعي لهرمون الاستروجين يعمل على تحفيز تمايز الخلايا بانية العظم والتي تعزز من متانة المادة الاساس، كما يعمل على تثبيط تحرر العوامل المحفزة لخلايا ناقضة العظم منها الساييتوكينات التي تزيد من نشاط خلايا ناقضة العظم

Macrophage –coloning ، Colony stimulating factor (GM-CSF) مثل
Tumor necrosis factor Interleukin-، stimulating factor (M-CSF)
Ishimi *et al.*,1990; Corboz *et al.* Interleukin-6(IL-6)´-α(TN،1(IL-1)
. (Lorenzo *et al.*,1987; *al.*,1992)

اشار الباحثان (Hughes & Boyce,1998) ان الساييتوكينات (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. (Krassas,2001) يكون للخلية البانية للعظم مستقبلات خاصة للاستروجين
هي الفا وبيتا Estrogen Receptor (ERα) , Estrogen Receptor (ER β)
حيث ان عمل الاستروجين النباتي يكون بالارتباط مع مستقبلات الاستروجين ER
ويكون المستقبل الثاني وهو (ER β) هو الالهة (Kuiper & Gustafsson,1997).
حيث يكون للاستروجين دور مهم في دراسة مظهر العظم في الجرذان مزالة المبايض
ويؤدي عمله عن طريق ارتباطه بهذه المستقبلات الموجودة على خلايا بانية العظم و هي
المعبر عنها وراثيا بالانسان لخلايا Thymus الزعرية والطحال Spleen والمبيض
Ovary والخصى Testis (Turner *et al* ,1994) ويعبر عنها وراثيا في الخلايا
البانية العظم Osteoblast في عظم الجرذ ولذلك يعتبر الاستروجين من اهم الهرمونات
الجنسية في منع هشاشة العظام (Onoe *et al* ,1997;Kusee *et al* ,1998).

ان عملية osteoclastogenesis في خلايا mesenchymal linkage والتي
اكتشفت في السنوات الاخيرة تعتمد على ثلاثة انواع من البروتينات في TNFs signal
اثنان منهما RANK & RANKL-cytokine like molecule ، ان RANK يعبر
عنها جينيا من خلايا hemopoietic osteoclast progenitor (Yasuda *et al.*,1998)
ان RANKL يعبر عنها جينيا Pre osteoblastic cell وخلايا T lymphocyte
وا عملة الارتباط تكون ذات الفة عالية بن RANK الى RANKL هذا
الارتباط القوي مهم لتنشئة خلايا ناقضة العظم osteoclast (Anderson *et al.*,1997)
.وان البروتين الثالث هو osteoprotegerin (OPG) هو الالهة في عملية تنشئة خلايا

ناقضة العظم بارتباطه مع البروتينات السكرية glycoprotein وهو عامل مثبط قوي على عملية osteoclastogenesis وادمصاص العظم في داخل وخارج الجسم (Simonet *et al.*,1997 ;Bucay *et al.*,1998).

وفي دراسة اخرى (Cesnjaj *et al* ,1991) اوضح ان نقص هرمون الاستروجين يعزز تكوين بروتينات التي تضر بتكوين العظم بالمراحل الاولى من تطوره مثل osteogenin,bone, morphogentic proteins .

ان الهرمونات الجنسية لها دور كبير في فعالية ووظيفة العظم وذلك لعملها في تنظيم توازن المعادن في النسيج العظمي اذ ان الاضطراب في مستويات هذه الهرمونات تؤدي للاصابة بهشاشة العظام، وتتأثر فعالية هرمون الاستروجين بمستويات هرمونات اخرى داخل الجسم مثل (هرمون calcitonin , وهرمونات جار الدرقية (PTH) , 1,25 dihydroxy vitamin D) وكذلك بعوامل مختلطة. (Turner *et al.*,1994)

كذلك وجدت اختلافات متميزة لتوازن الكالسيوم في هشاشة العظام ان امتصاص الامعاء للكالسيوم يزداد بسبب فعل PTH ومن خلال فعل فيتامين D3 وامتصاص الكالسيوم الفعال في الامعاء يكون تحت سيطرة (OH₂)D 1,25 وكذلك ايض فيتامين D3 يزيد من بناء البروتينات المرتبطة مع الكالسيوم في خلايا الامعاء الذي يعزز من امتصاص الكالسيوم فيزداد مستواه في مصل الدم بالحيوانات مزالة المبايض .

وتعتبر هرمونات الجار الدرقية Parathyroid Hormone و (1,25-dihydroxy vitamins D3) ، وكذلك الكالسيتونين Calcitonin هي منظمات لتوازن الكالسيوم ويعتبر عدم التوازن بها احد مسببات فقدان العظم وان هذه التغيرات كلها بالهرمونات تؤدي الى مرض هشاشة العظام Osteoprosis , (Zhou *et al.*,1993) . ان هرمونات (PTH) تزيد مستويات الكالسيوم وبالتالي زيادته في ادمصاص العظم بواسطة تحفيز نشاط خلايا ناقضة العظم وهي ايضا تزيد من اعاده امتصاص الكالسيوم في النببيات الكلوية في الكلى (Mechanick *et al* ,1997) .

والنتائج غير متفقة مع كل من (Aspray et al, 2005) و (Xie F et al, 2005) و (Brunette and Leclerc, 2001) حيث لاحظوا انخفاض في مستويات الكالسيوم بمجاميع المزالة المبايض.

ويعتبر العلاج الهرموني البديل هو الاله في منع حالة التدهور في كتلة العظم, فبعد العلاج بالاستروجين النباتي phytoestrogen للمجموعة مزالة المبايض وجد انخفاض معنوي في مستوى الكالسيوم وهي نتائج متفقة مع (Davis, 1998).

وجد (Sebastian , et al, 1994) ان اي ضعف في الاخراج الكلوي للاحماض ربما ينتج التوازن الايجابي للاحماض وهذا التوازن الايجابي ربما يرتبط مع فقدان انزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP) والكالسيوم من العظم الذي ممكن ان يؤدي الى الاصابة بمرض هشاشة العظام osteoporosis والتوازن السلبي للكالسيوم ربما يحدث فقدان الكالسيوم من الكلى (Batlle, 1996; Sebastian et al, 1994). وكذلك تأثير الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) على زيادة مستوى هرمون Estrogen في مجموعة G4 بالنتائج وهي المجموعة المعالجة بعد تعرضه لازالة المبايض يكون متفق مع نتائج (AL Sawyan N, 2010) حيث لوحظ ان زيادة للاستروجين بعد العلاج تكون مفيدة ايضا في بناء وتكوين العظم.

ان انخفاض مستوى الاستروجين في الدم نتيجة لازالة المبايض يؤدي الى تحفيز الخلايا الناقضة للعظم Osteoclast والتي تؤدي الى الزيادة في ادمصاص العظم resorption والتي ممكن ان تثبط فعالية الخلية ناقضة العظم باعطاء الجرعة المناسبة للاستروجين النباتي كعلاج بديل اكد باستعمال الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) كعلاج بديل لنساء بسن الياس لتعويض نقصان هرمون الاستروجين بديل (Knight & Eden, 1995; Gassidy, 1996; Norhaiza et al, 2009).

ان العلاج البديل بالاستروجين النباتي يعمل على تثبيط ميكانيكية نشوء خلايا ناقضة العظم (osteogenesis) وقد يعمل الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) على كبح فعالية خلايا الناقضة للعظم Osteoclast (Blair et al, 1996; Cassidy, 1996). بالاضافة الى تثبيط التصاق الخلية الناقضة على سطح العظم (Ross, 1991).

وتتفق نتائج الدراسة الحالية حول انخفاض مستوى الاستروجين في حيوانات مزالة المبايض مع نتائج دراسات اخبرى (Yalin *et al* , 2005; Dang and Lowik,2005) بحيث وجدت في هذه الدراسة انخفاض مستوى الاستروجين الذي يقلل من مضادات الاكسده الدفاعية بالجسم ويحث تكوين التعبير الجيني ل TNF- α التي تؤدي الى فقدان العظم bone loss وتكوين هشاشة العظام Osteoporosis.

ولاحظ (Basu *et al* , 2001) وجود علاقة بين بيروكسيد الدهون وكتلة العظم من المعادن BMD من خلال قياس مستوياته في ادرار النساء المصابات بهشاشة العظام osteoporosis اضافة لزيادة Lipid Peroxidation وينتج عنه زيادة في فعالية MDA (Manalogas,1999).

و للكالسيوم علاقة مع مرض هشاشة العظام osteoporosis حيث اكدت دراسة بزيادة اخذ جرعات الكالسيوم مع الغذاء في حالة مرضى هشاشة العظام للتعويض من النقص الحاصل بمستويات الكالسيوم لدى المرضى المصابين بالهشاشة وكذلك فقدان الكثير من المعادن الاخرى فتقل كتلة العظم من المعادن (McNamara *et al*,2006) وذلك لوجود علاقة معنوية بين كتلة العظم وبعض المغذيات مثل البروتين والكالسيوم والمغنسيوم (Arsalan *et al* ,2003) .

4-1-5 التغيرات في معدل الفسفور P phosphorus

تشير نتائج الجدول (4-13) الى وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل الفسفور ومجموعة السيطرة G1. وكذلك يوضح الجدول (4-12) 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) .

تدل النتائج الى وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل الفسفور 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.

تشير النتائج لانخفاض معدل الفسفور في المجموعة مزالة المبايض لارتفاع معدل الكالسيوم في هذه المجموعة حيث يكون التناسب عكسي بين الكالسيوم والفسفور بمصل الدم (Wronski et al, 1991).

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 بائية العظم Osteoblast وخلايا ناقضة العظم Osteoclast (Bacon et al, 2004 ; Streeten et al, 2008).

كذلك للاستروجين النباتي تاثير وقائي وحماية ضد فقدان العظم المتسبب بسبب نقصان الاستروجين لدى الحيوانات مزالة المبايض وهو يتوسط التعبير الجيني المتعلق بأبيض العظم (LiX et al , 2009).

بدراسة (Laio et al, 2004) والذي استخدم علاج مستخلص من عشبة معينة للحيوانات مزالة المبايض حيث اوضح ان هذا العلاج ليس له تاثير على الرحم ولكنه يقلل من فقدان الاستروجين ويعزز مستواه في مصل الدم وهذا يحمي من فقدان العظم في الجرذان مزالة المبايض ويعزز استخدام الاستروجين النباتي بدل الصناعي كعلاج بديل .

تتفق نتائج الدراسة حول انخفاض معدل الفسفور في مجموعة الارانب مزالة المبايض مع (Bourrinwen et al., 2002)، (Kim et al., 2006)، (Macdonald et al, 2004) و (Geusens et al , 1996) حيث قد يكون السبب للتحفيز القوي لهرمونات جار الدرقية وارتفاع 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 .

وبينت الدراسات ان اكسدة الدهون Lipids Oxide تؤثر في خلايا بانينة العظم Osteoblast والخلايا الناقضة العظم Osteoclast (Manolagas ,2000) .

وتتفق نتائج دراستنا الحالية مع (Kim et al , 2006 ; Iwamoto et al ,2003) حول انخفاض معدل الفسفور و زيادة مستوى الكالسيوم في مصل الدم لدى الحيوانات مزالة المبايض G2. حيث لاحظ انخفاض في مستويات الكالسيوم في النساء بسن مابعد الياس في دراسة اجراها وازدياد معدل الفسفور وتكون هذه النتائج عكس نتائج دراستنا (Aspray et al ,2005) .

واوضح (Rejnmark ,2008) بالمعالجة بالاستروجين للفئران مزالة المبايض والمعالجة باحد المواد الحاوية على الاستروجين النباتي انخفاض معدل الكالسيوم وارتفاع معدل الفسفور .

5-1-5 التغيرات في معدل Alkaline phosphatas (ALP)

تشير نتائج الجدول (4-12) 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 (4-12) 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 .

يلاحظ من خلال نتائجنا ارتفاع معنوي في معدل ALP في الحيوانات مزالة المبايض G2 يكون متفق مع دراسة (Turner ,2002) و(Chavassienx et al ,2001) ويلاحظ انه بارتفاع ALP يرتفع تحويل العظم bone turnover .

ان زيادة مستوى ALP في دراستنا 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 . (AL-Sowyan N and Nadia ,2010)

كذلك لاحظ (Turner *et al* ,1995) ارتفاع انزيم الفوسفاتيز القاعدي وهو احد المؤشرات الكيميائية لمكونات العظم في الحيوانات وهي مجموعة الاغنام مزالة المبايض وهذا متفق مع الدراسة الحالية حول ارتفاع هذا الانزيم في المجموعة مزالة المبايض وهذا يؤدي الى تحويل العظم وزيادته تكون مشابهه للحالات التي تحصل في النساء في سن مابعد الياس Post menopausal .

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 كساح العظم وامراض سرطان العظم وهشاشة العظام) بسبب تنخر العظم مما يؤدي الى زيادة بتسرب الانزيم الى مصل الدم وهكذا يزداد مستوى انزيم ALP في مصل الحيوانات مزالة المبايض (ميرك , 1996 ; Fair and Krassner 1971) . او قد يعزى سبب ارتفاع 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 (Norman *et al*.1970 ; Ganon, 1997).

ولم تتفق دراستنا مع (Namkung *et al*.,2001) و (Ross,1996) حيث لاحظ انخفاض في معدل ALP بالحيوانات مزالة المبايض . حيث انه لم يلاحظ اي تغيير معنوي في معدل ALP في الحيوانات مزالة المبايض .

توضح النتائج ايضا انخفاض معنوي $p < 0.05$ مستوى انزيم ALP في المجموعة المعالجة بالجرعة المؤثرة بالاستروجين النباتي (G3) مقارنة بمجموعة السيطرة G1 والمجموعة المزالة المبايض G2 وكذلك يلاحظ انخفاض غير معنوي بانزيم ALP في المجموعة المزالة المبايض والمعالجة بالجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي (G4) ويكون التأثير ايجابي للاستروجين النباتي

على مستوى انزيم ALP وتتفق النتائج الحالية مع (Coxam, 2005) حيث لاحظ ان المعالجة بالاستروجين النباتي له دور في انخفاض مستوى فعالية انزيم ALP في مصل دم اناث الارانب التي حقنت عضليا بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي ولمدة 6 أشهر .

وكذلك تتفق النتائج حول انخفاض معدل ALP في المجموعة G3 المعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي Phytoestrogen مع دراسة (Hankenson *et al*, 2005) حيث لاحظ انخفاض معدل ALP في مجموعة الحيوانات المعالجة بالاستروجين النباتي .

2-5 التغيرات النسيجية Histopathological Changes

4-2-1- تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على نسيج العظم

بعد مرور 6 أشهر من إزالة المبايض اخذت مقاطع نسيجية من منطقة الفخذ لوحظت التغيرات المرضية الواضحة على النسيج العظمي وذلك من خلال زيادة في حجم الفجوات lacunae وزيادة الفراغات بين متن العظم، وتطاول في قنوات فولكمان صورة (4-6) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة صورة (4-5) .

اشارت الدراسة الحالية الى حصول تدهور بالنسيج العظمي حيوانات مزالة المبايض وقد اتفقت النتيجة مع عدة دراسات (Adnanm, 2010)، (Liux *et al*, 2010)، (Kamran *et al*, 2010)، (Arsalan *et al*, 2003)، (Castaneda *et al*, 2008) و (Giavaresi *et al*, 2008) ان انخفاض مستوى الاستروجين نتيجة لازالة المبيض يعزز ويزيد من فعالية خلايا ناقضة العظم وبالتالي يزيد الادمصاص (resorption) 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 (Kubo *et al*, 1999); (Kamran *et al*, 2010); (Fujmoto *et al*, 2001);

(Namkung-matthai *et al.*,2002); كما ان تولد الجذور الحرة بتقدم العمر تؤدي الى فقدان كتلة العظم بالاضافة الى تموت الخلايا العظمية (osteocyte Manolagas & Parfitt 2010) و(Levasseur,2009)، (Cagnacci *et al.*,2003). 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 مزالمة المبايض . (Lane *et al.*,2006 ;Almeida *et al.*,2007) .

وان اهمية الاستروجين في ايض العظام تتأثر بحصول الطفرة في مستقبلات الاستروجين estrogen receptor (Smith *et al.*,1994)، او الطفرة في جين p450 aromatase gene (Morishima *et al.*,1995; Carani *et al.*,1997). ان حصول الطفرة في جين p450 aromatase gene تعمل على غلق epiphysis وزيادة في كتلة العظم والنتيجة من الانخفاض الكبير في مستوى هرمون الاستروجين او في حالات سن اليأس في النساء (Khosla *et al.*,1998) وكذلك في الرجال في سن الشيخوخة.

اما مجموعة الحيوانات التي تم حقنها عضليا بـED50 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 (4-8) بمقارنتها بمجموعة مزالمة المبايض صورة (6-4) ويلاحظ بمقطع النسيج العظمي مجموعة الارانب المعالجة بدون ازالة المبايض قلة في طول قنوات فولكمان وزيادة في كثافة العظم وصغر حجم الفجوات صورة (4-7) .

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Liux *et al.*, 2010)، (Nadia ,2010)، (Kamran *et al.*,2010) و(Cagnacci *et al.*,2003) حيث لاحظوا ان العلاج بالاستروجين النباتي لنبات الفاصوليا البيضاء اليابسة ذو فعالية جيدة على نسيج العظمي فيكون المقطع خالي من التجايف الموجودة بالمجموعة مزالمة 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 (Wolters *et al.*,2004 ;Rejnmark *et al.*,2004)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 .

2-2-4 تأثير الحقن العضلي بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي على

نسيج الرحم

اظهرت نتائج التقطيع النسيجي صورة (4-10) لانسجة الرحم لمجموعة الارانب مزالة المبايض وجود تفكك واضح بالنسيج للطبقات الداخلية للرحم والخلايا غير فعالة وقلّة التغذية الدموية وقلّة عدد الغدد الرحمية مقارنة مع صورة (4-9) وهي المقطع النسيجي الطبيعي لمجموعة السيطرة .

ان انخفاض مستوى تركيز هرمون الاستروجين يؤدي الى عدم التوازن بين المؤكسدات ومضادات الاكسدة اي حصول حالة اجهاد تأكسدي وبالتالي زيادة في تولد الجذور الحرة وفعالها المـؤثر على أغشية الخلايا (Bagchi *et al.*,2003 ;Hamed *et al.*,2010).بالاضافة الى ان انخفاض مستوى هرمون الاستروجين يؤدي الى زيادة في أكسدة الدهون Lipid peroxidation والتي تقود لزيادة الدهون وتجمع الخلايا الدهنية. (Freed , 2004)

وتظهر الصورة (4-11) النسيج الرحمي لمجموعة الارانب المعالجة بالجرعة المؤثرة ED50 للاستروجين النباتي والتي بلغت (0.2 mg/ kg) والغير مزالة المبايض وجود تغذية دموية عالية بالنسيج وكذلك كثرة عدد الخلايا والغدد الرحمية وفرط نسيج البطانة الرحمية مقارنة مع صورة (4-10) ومجموعة السيطرة (4-9).

نتائج الدراسات الحالية مع اتفقة (Ishimi *et al*,2000; Tang *et al* ,2005; Meixia *et al*,2010) حيث لاحظوا ان المعالجة بالاستروجين النباتي للجرذان والمستخلص من مصادر عديدة من الاعشاب ومنها الشاي الاخضر و فول الصويا وغيرها حيث تكون ذات تأثيرات ايجابية على نسيج الرحم حيث يحفز ويزيد بعدد الخلايا اي فرط التنسج .

ويبين من خلال التقطيع النسيجي للرحم صورة (4-12) في مجموعة الارانب مزالة المبايض والمعالجة بالحقن العضلي للجرعة المؤثرة للاستروجين النباتي حيث يلاحظ قلة الاوعية الدموية وتحفيز لخلايا البطانة الداخلية للرحم التي تكون غير فعالة ولاوجود لزيادة غير طبيعية بخلايا الرحم مقارنة مع(4-11) المجموعة المعالجة وغير مزالة المبايض ومجموعة السيطرة G1 صورة (4-9).

وهي نتائج متفقة مع (Blair *et al* ,1996).الذين لاحظوا ان المعالجة بالاستروجين النباتي للجرذان مزالة المبايض الذي يزيد من عدد الخلايا للبطانة الداخلية للرحم ويزيد من انقسامها. قد يكون السبب لفعل الاستروجين الذي يعتبر احد مضادات الاكسدة وله الدور بتقليل الجذور الحرة ويقلل عملية تأكسد الدهون Lipid peroxidation ،اضافة لدور المركبات الفينولية التي تحافظ على اغشية الخلايا وتأثيرها في كبح الجذور الحرة وتقليل التأثيرات التي تصيب الانسجة .

كما ان لمحتوى الاستروجين النباتي من الفلافونديينات والمحتوى الفينولي تبين ان له الفعالية العلاجية كمضاد للالتهاب ومضاد للاكسدة (Karim *et al*, 2011; Fazliana *et al*,2011).

سجلت الابحاث (Miksicek ,1995);(Resncik *et al*, 1997); (Messina *et al*,1995); (Gibs,2000) ، ان للاستروجين النباتي فوائد كبيرة كعلاج بديل للنساء في سن اليأس حيث يكون الاستروجين النباتي ليس له أي آثار جانبية حادة على الرحم او الثدي بينما يلاحظ ان الاصابة بسرطان الرحم او الثدي هي من الآثار الجانبية السلبية لاستعمال الاستروجين الصناعي كعلاج بديل في سن اليأس.

3-5- التغيرات الجزيئية

3-5-1- تأثير المستخلص على نشاط الجينات المسؤولة عن إنتاج المادة البينية للعظم

تم استخلاص الحامض النووي RNA من عينات العظام للارانب مزالة المبايض بواسطة طريقة فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وقد استخدم جهاز خاص وهو ال Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) لقياس تركيز الحامض النووي RNA ومدى النقاوة (نسبة البروتين الى الحامض النووي) حيث يبين الجدول ادناه ان الحامض النووي RNA المستخلص كان بنقاوة عالية (1.8-2.0) عند القياس على الطول الموجي 260-280 نانومتر حيث يقيس الطول الموجي 260 نانومتر مستوى الحامض النووي اما الطول 280 نانومتر فانه يقيس مستوى البروتين في العينة وكلما زادت النسبة لتصل الى 2 تعكس زيادة الحامض النووي وقلة البروتين بالعينة، حيث تعتبر هذه العينة عالية النقاوة. ان ارتفاع نقاوة العينة يعكس مدى دقة النتائج المستحصلة في دراسة النشاط الجيني بتقنية RT-PCR. كما في شكل (4-13) الذي يمثل نتائج استخلاص RNA

3-5-2- استخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الانى (RT-PCR) في قياس مستوى

النشاط الجيني بعد المعاملة بالاستروجين

تمت دراسة مستوى النشاط الجيني للجينات المسؤولة عن إنتاج المالددة البينية للعظم مثل Col I و Fibronectin اضافة الى دراسة مستقبلات الاستروجين Kappa B في حيوانات التجربة الى مجموعة السيطرة G1 ومجموعة G2 وهي الحيوانات مزالة المبايض ومجموعة G3 مجموعة الحيوانات المعالجة بدون ازالة المبايض ومجموعة G4 اناث الارانب مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص. لقد تم تقدير كمية الحامض النووي RNA المنتج بعد تأثر ذلك الجين بالمعاملة. ولتقدير كمية الحامض النووي RNA استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الانى او ال RT-PCR. ان المبدأ الاساسي لهذا التفاعل يعتمد على مضاعفة عدد نسخ ال RNA بعد تحويلها الى DNA المقابل cDNA.

فاذا كان الجين نشطا فان كمية الـ RNA المنتجة تكون عالية وبالتالي فان جهاز RT-PCR يمكن ان يسجلها بعدد اقل من دورات التفاعل (cycle time) (CT value) مقارنة بالجين في الحالة غير النشطة. يجب معايرة قيمة CT مع قيم CT للجينات الاخرى ذات النشاط الثابت ولا تتأثر بالمعاملة الحالية مثل جين البيتـا اكتين B-actin والذي يسمى بجين المعايرة House keeping gene .

لقد استخدمت طريقة (Livak Method $2^{-\Delta\Delta CT}$) في حساب التعبير النسبي في نشاط الجينات بعد المعاملة بالاستروجين النباتي (Wang and Hardy, 2004) .

لغرض زيادة دقة التجربة المصممة لقياس مستوى النشاط الجيني بعد المعاملة بالاستروجين النباتي، تم التحقق من تخصص البادئات (primers) المستخدمة في تفاعل سلسلة البلمرة الانـي (RT-PCR) باجراء مايسمى بمنحنى تخصص البادئات (melting curve) .

اذا كان لهذا المنحنى قمة واحدة فانه يشير الى وجود تفاعل واحد لمضاعفة نسخ الـ cDNA في تفاعل البلمرة. اما اذا كانت اكثر من قمة واحدة فهذا يعني وجود اكثر من تفاعل في سلسلة البلمرة. اي ان البادئات (Primers) غير متخصصة بمضاعفة الـ cDNA للجين تحت الدراسة وانما ضاعفت جينات اخرى لاعلاقة لها بالدراسة. في دراستنا الحالية نلاحظ ان كل منحنيات تخصص البادئات (melting curve) ذات قمة واحدة شكل (4-14)، (4-15) و (4-16) .

هذا يشير الى دقة التجربة الحالية وجودة تصميم البادئات (Primers) المستخدمة لقياس النشاط الجيني في سلسلة تفاعل البلمرة الانـي RT-PCR .

5-3-3- تأثير المعاملة بالمستخلص النباتي على الكولاجين I

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المعالجة بمستخلص الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) حفزت التعبير الجيني لمستويات الكولاجين نوع 1 وتبين من النتائج الوراثية ان مستويات الكولاجين نوع 1 في خلايا البانية للعظم osteoblast ذات زيادة معنوية تعود للمعالجة بالمستخلص النباتي .

وقد اظهرت نتائج التعبير الجيني لجين Collagen type I في هذا الدراسة لوجود لفروقات معنوية في مستوى التعبير الجيني للحامض النووي RNA للمجموعة G2 المزالة المبايض (1.38 ± 0.57) ومجموعة G3 المعالجة بدون ازالة المبايض (1.13 ± 0.47) مقارنة الى مجموعة السيطرة .اما بالنسبة للمجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص G4 فقد اظهرت زيادة معنوية (تنظيم مرتفع UP regulation) (3.81 ± 1.28) في التعبير الجيني للكولاجين نوع I collagen type I. كما في صورة 2

4-3-5 تأثير المعاملة بالمستخلص النباتي على الفايبرونكتين Fibronectin

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المعالجة بمستخلص الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) حفزت التعبير الجيني لمستويات الفايبرونكتين وتبين من النتائج الوراثية ان مستويات الفايبرونكتين في خلايا البانية للعظم osteoblast ذات زيادة معنوية تعود للمعالجة بالمستخلص النباتي .

ونتائج التعبير الجيني للفايبرونكتين طبيعية للجين القياسي لجينات الدراسة B-actin .واوضح منحنى التفكك وجود قمة مفردة لكل PCR التفاعل يشير انه تفاعل PCR ينتج منتج واحد بدون اي تفاعل غير خاص الذي ممكن يرفع نسبة الاخطاء للنتائج النهائية .كما في شكل 3 وشكل 4

وقد اظهرت نتائج التعبير الجيني لجين الفايبرونكتين في هذا الدراسة لوجود لفروقات معنوية في مستوى التعبير الجيني للحامض النووي RNA للمجموعة G2 المزالة المبايض (2.26 ± 1.17) ومجموعة G3 المعالجة بدون ازالة المبايض (10.2 ± 5.59) مقارنة الى مجموعة السيطرة .اما بالنسبة للمجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص G4 فقد اظهرت زيادة معنوية (تنظيم مرتفع UP regulation) (18.25 ± 7.55) في التعبير الجيني للفايبرونكتين fibronectin .

5-3-5 تأثير المعاملة بالمستخلص النباتي على Kappa B

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المعالجة بمستخلص الاستروجين النباتي (Phytoestrogen) حفزت التعبير الجيني لمستويات Kappa B وتبين من النتائج ان مستويات Kappa B في النسيج العظمي ذات زيادة معنوية تعود للمعالجة بالمستخلص النباتي .

وقد اظهرت نتائج التعبير الجيني لجين Kappa B في هذا الدراسة لوجود لفروقات معنوية في مستوى التعبير الجيني للحامض النووي RNA للمجموعة G2 المزالة المبايض (0.61±0.18) ومجموعة G3 المعالجة بدون ازالة المبايض (0.7±0.17) مقارنة الى مجموعة السيطرة .

اما بالنسبة للمجموعة مزالة المبايض والمعالجة بالمستخلص G4 فقد اظهرت زيادة غير معنوية (0.9±0.52) في التعبير الجيني للكولاجين نوع Kappa B. كما في صورة 1

ان عملية osteoclastogenesis تعتمد على ثلاث انواع من البروتينات هي Receptor activator of nuclear factor (NF-κB)-ligand(RANKL) ومستقبله RANK وتوجد الفة عالية للارتباط بينهما وهذا الارتباط مهم لتنشئة خلايا ناقضة العظم Osteoclast (Yasuda *et al.*,1998) .

البروتين الثالث هو بروتين Osteoprotegrin OPG وهو عامل مثبط قوي على عملية osteoclastogenesis وادمصاص العظم داخل وخارج الجسم . (Simonet *et al.*,1997).

ان عملية ادمصاص العظم تعود للزيادة بعملية Osteoclastogenesis لخلايا ناقضة العظم ومن اهم الساييتوكينات التي تؤثر على عملية أيض العظم هي RANKL وRANK والتي تزيد من فعالية خلايا ناقضة العظم وكذلك البروتين المثبط لعمل هذه الساييتوكينات وهو OPG (Lindberg *et al.*,2001) .

ان التغيرات المتعاقبة في نظام OPG/RANKL/RANK يعتبر احد مسببات مرض هشاشة العظام حيث ان الزيادة في نسبة RANKL الى OPG تعزز تمايز وتنشيط خلايا ناقضة العظم مما يزيد في فقدان كتلة العظم ويؤدي لادمصاص العظم وبالتالي تزداد الاصابة بمرض هشاشة العظام Osteoporosis, وان تطور مرض الهشاشة يكون خطرا جدا لدى الذين لديهم طفرة وراثية في RANK/RANKL (Kong *et al.*,1999; Kitazawa *et al.*,1999; Saika *et al.*,2001).

ومن العوامل التي تعزز زيادة نسبة RANKL الى OPG هي تناول المفرط لادوية Glucocorticoids والنقص الشديد لهرمون الاستروجين وان ازالة المبايض تؤدي لنقص هرمون الاستروجين (Teitelbaum,2000) (Sasaki *et al.*,2001).

وان نسبة RANKL الى OPG تختزل بالمعالجة (17 β -estradiol, raloxifene, phytoestrogen) والمعالجة بالاستروجين للفئران مزالة المبايض يقلل مستوى الانترلوكينات والسايوتوكينات وثبط قلة فقدان كتلة العظم حيث انه يثبط التعبير الجيني لكل الدلالات لخلايا ناقضة العظم من ضمنها RANKL و RANK وايضا (Hsu *et al.*,2011). Cathepsin K, NFATC1, TRAP .

الاستروجين النباتي يعزز انتاج بروتين OPG في خلايا بانية العظم خلال الاعتماد على ميكانيكية مستقبلات الفا للاستروجين ER- α والذي يكبح التعبير الجيني لـ RANKL ولله التأثير على عملية Osteoclastogenesis . (Yamagishi *et al* 2001; Chen *et al.*,2002).

وان ميكانيكية تداخل الاستروجين مع نظام OPG/RANKL/RANK متعلقة بفعاليته بكبح وتثبيط هذا النظام بواسطة فعالية-17-estradiol of c-jun N terminal kinase (JNK) مما يؤدي الى تنظيم جيني منخفض down regulation لمسار RANKL(κ B). (Shevde *et al* .,2000; Srivastava *et al.*,2001).

7-3-5 دراسة الفعالية الحيوية لخلايا العظم بعد المعاملة بالاستروجين النباتي

قبل 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 بتركيز تصاعدي (12.5 إلى 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 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.

8-3-5 تأثير الاستروجين النباتي على النشاط الجيني لجينات الكولاجين والفيبرونكتين في الخلايا العظمية

استخدمت خلايا العظم Osteoblast لدراسة تأثير الاستروجين النباتي على فعالية جينات الكولاجين نوع I والفيبرونكتين في بادئ الامر تم معاملة الخلايا بتركيز واطى (25 مايكروغرام /مل) وتركيز عالي (50 مايكروغرام /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 50 مايكروغرام /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. 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. (Haidong et al., 2011) لذلك نلاحظ في الدراسة الحالية ان الجرعة العالية من الاستروجين النباتي (50 مايكرو غرام / مل) ادت الى انخفاض في مستوى انتاج الكولاجين والفايبرونكتين ($p < 0.05$) مقارنة بالسيطرة

الملاحق

APPENDIX

cDNA synthesis results

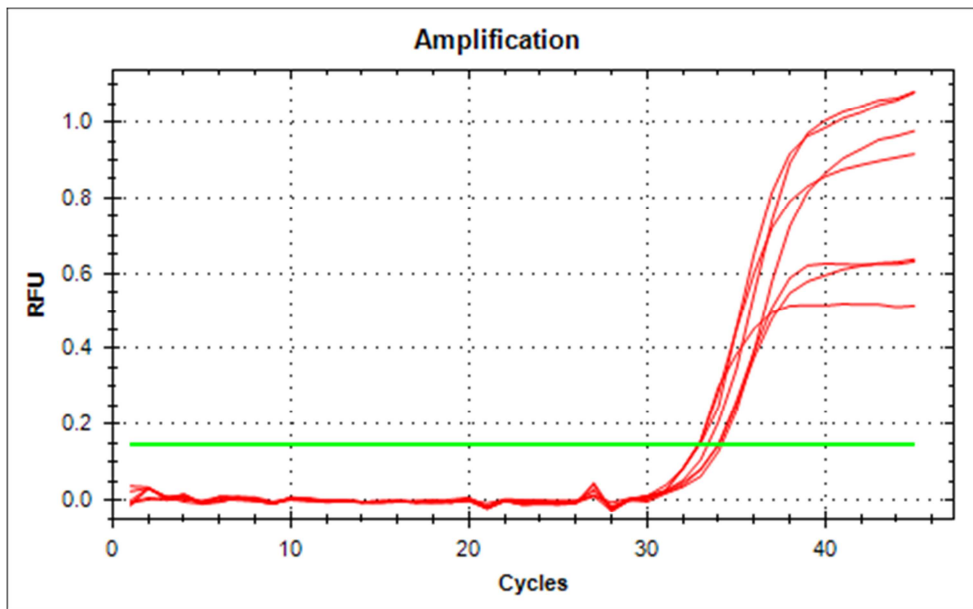
نتائج بناء

العينات	cDNA Concentration (ng/ μ L)	cDNA Purity (260/280nm)
T1 A	902.8	1.75
T1 B	828.1	1.72
T1 C	930.0	1.78
T1 D	740.0	1.72
T2 A	693.3	1.74
T2 B	747.6	1.71
T2 C	730.0	1.74
T2 D	967.2	1.75
T3 A	791.6	1.72
T3 B	738.8	1.74
T3 C	801.2	1.69
T3 D	969.0	1.56
T4 A		
T4 B		
T4 C		
T4 D		

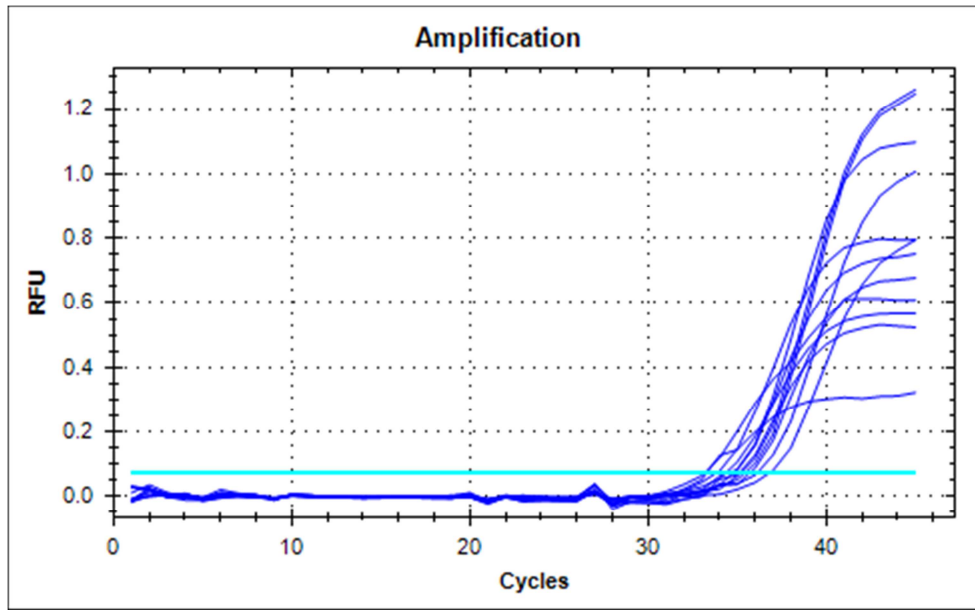
4-3- Quantitative Real-Time PCR results نتائج التحليل الجيني

Gene	Sample	CT value
Actin	C	32.16
Actin	C	32.74
Actin	C	32.12
Actin	T1	32.95
Actin	T1	32.91
Actin	T1	32.82
Actin	T2	32.37
Actin	T2	32.90
Actin	T2	32.61
Actin	T3	32.14
Actin	T3	32.85
Actin	T3	32.97
coll-1	C	36.83
coll-1	C	33.30
coll-1	C	34.38
coll-1	T1	35.12
coll-1	T1	34.55
coll-1	T1	35.72
coll-1	T2	35.44
coll-1	T2	34.80
coll-1	T2	35.20
coll-1	T3	33.13
coll-1	T3	33.86
coll-1	T3	33.18
FN1	C	42.22
FN1	C	41.22
FN1	C	40.69
FN1	T1	41.41
FN1	T1	40.33
FN1	T1	41.58
FN1	T2	39.50
FN1	T2	38.21
FN1	T2	38.48
FN1	T3	37.97
FN1	T3	37.96
FN1	T3	37.54
kappaB	C	35.07
kappaB	C	34.30

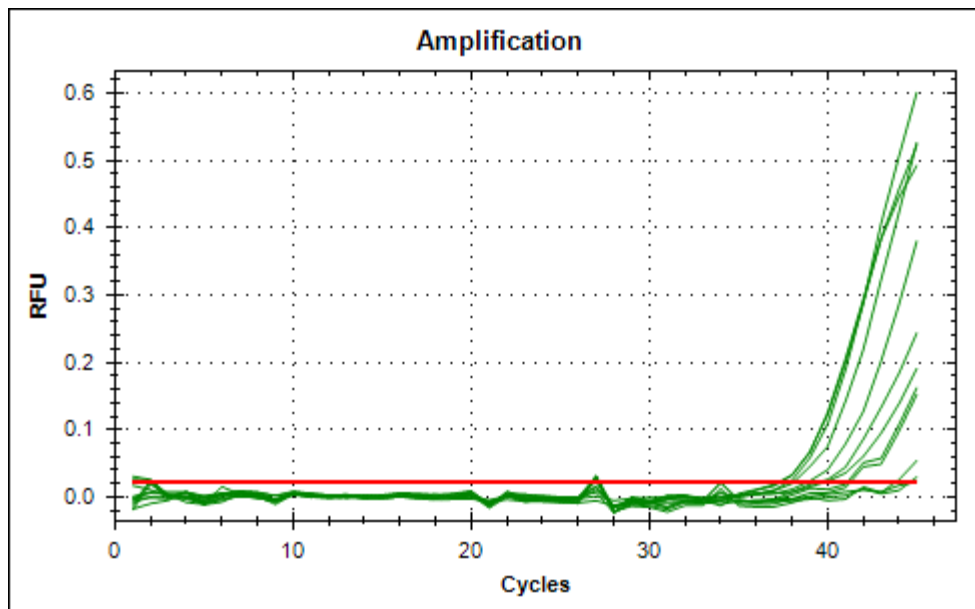
kappaB	C	35.37
kappaB	T1	36.06
kappaB	T1	36.21
kappaB	T1	35.34
kappaB	T2	35.06
kappaB	T2	36.10
kappaB	T2	35.06
kappaB	T3	34.38
kappaB	T3	34.61
kappaB	T3	36.76



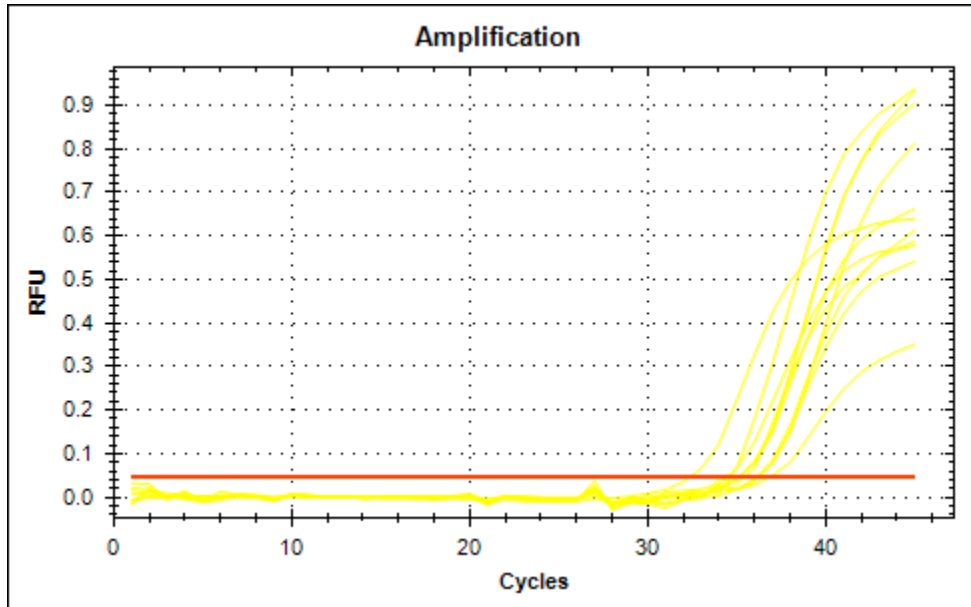
Amplification plot of B-actin gene



Amplification plot of collagen 1 gene



Amplification plot of FN1 gene



Amplification plot of kappaB gene

APPENDIX

العينات	CT Coll-I	CT B-actin	Δ CT test	Δ CT control	$\Delta\Delta$ CT	Fold change	mean
T1	35.12	32.95	2.17688463373999	2.619019754	-0.44213512051255	1.358613524162350	1.383617
T1	34.55	32.91	1.64216990490720	2.619019754	-0.97684984934535	1.968163193865330	
T1	35.72	32.82	2.89817551466650	2.619019754	0.27915576041395	0.824073109186152	
T2	35.44	32.37	3.07212089586460	2.619019754	0.45310114161205	0.730470977062429	1.133476
T2	34.80	32.90	1.89606069785771	2.619019754	-0.72295905639484	1.650563973446690	
T2	35.20	32.61	2.59130965807500	2.619019754	-0.02771009617755	1.019392819488620	
T3	33.13	32.14	0.98870104150580	2.619019754	-1.63031871274675	3.095813822768230	3.809177
T3	33.86	32.85	1.01780601021949	2.619019754	-1.60121374403305	3.033984560692910	
T3	33.18	32.97	0.21364467850200	2.619019754	-2.40537507575055	5.297732781424600	

These results were calculated by (Livak) method as following:

First, the C_T of the target gene was normalized to that of the reference (ref) gene, for both the test samples and the calibrator strain (control samples):

$$\Delta C_T(\text{test}) = C_T(\text{target, test}) - C_T(\text{ref, test})$$

$$\Delta C_T(\text{calibrator}) = C_T(\text{target, calibrator}) - C_T(\text{ref, calibrator})$$

Second, the ΔC_T of the test strains were normalized to the ΔC_T of the calibrator:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{test}) - \Delta C_T(\text{calibrator})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = $(2^{-\Delta\Delta C_T})$: Normalized expression ratio

APPENDIX

Treatment	CT FN1	CT B-actin	Δ CT test	Δ CT control	$\Delta\Delta$ CT	Fold change	mean
T1	41.41	32.95	8.46178902408860	9.275012949	-0.81322392451425	1.757133644674160	2.266051
T1	40.33	32.91	7.42148070528500	9.275012949	-1.85353224331785	3.613839022880010	
T1	41.58	32.82	8.76184572422910	9.275012949	-0.51316722437375	1.427179922130120	
T2	39.50	32.37	7.12722242563980	9.275012949	-2.14779052296305	4.431485900003770	10.20388
T2	38.21	32.90	5.31193994265841	9.275012949	-3.96307300594444	15.595663275128800	
T2	38.48	32.61	5.87113189524790	9.275012949	-3.40388105335495	10.584498817488100	
T3	37.97	32.14	5.82765913964070	9.275012949	-3.44735380896215	10.908295699068500	18.25461
T3	37.96	32.85	5.11666702799599	9.275012949	-4.15834592060686	17.856110072985100	
T3	37.54	32.97	4.57460499930150	9.275012949	-4.70040794930135	25.999427473779600	

These results were calculated by (Livak) method as following:

First, the C_T of the target gene was normalized to that of the reference (ref) gene, for both the test samples and the calibrator strain (control samples):

$$\Delta C_T(\text{test}) = C_T(\text{target, test}) - C_T(\text{ref, test})$$

$$\Delta C_T(\text{calibrator}) = C_T(\text{target, calibrator}) - C_T(\text{ref, calibrator})$$

Second, the ΔC_T of the test strains were normalized to the ΔC_T of the calibrator:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{test}) - \Delta C_T(\text{calibrator})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation $= (2^{-\Delta\Delta C_T})$: Normalized expression ratio

APPENDIX

APPENDIX

Treatment	CT kappaB	CT B-actin	ΔCT test	ΔCT control	ΔΔCT	Fold change	mean
T1	36.06	32.95	3.10881127082000	2.235915244	0.87289602667470	0.546049624605416	0.614526
T1	36.21	32.91	3.30191844607650	2.235915244	1.06600320193120	0.477640408110342	
T1	35.34	32.82	2.52241692769560	2.235915244	0.28650168355031	0.819887753410318	
T2	35.06	32.37	2.69151683807420	2.235915244	0.45560159392890	0.729206034801912	0.700123
T2	36.10	32.90	3.19900566798310	2.235915244	0.96309042383781	0.512956921045576	
T2	35.06	32.61	2.45651827747730	2.235915244	0.22060303333200	0.858206638930145	
T3	34.38	32.14	2.24143560263640	2.235915244	0.00552035849110	0.996180890496260	0.907306
T3	34.61	32.85	1.76490506311180	2.235915244	-0.47101018103350	1.386079667117280	
T3	36.76	32.97	3.79376912100010	2.235915244	1.55785387685480	0.339655971397888	

These results were calculated by (Livak) method as following:

First, the C_T of the target gene was normalized to that of the reference (ref) gene, for both the test samples and the calibrator strain (control samples):

$$\Delta C_T(\text{test}) = C_T(\text{target, test}) - C_T(\text{ref, test})$$

$$\Delta C_T(\text{calibrator}) = C_T(\text{target, calibrator}) - C_T(\text{ref, calibrator})$$

Second, the ΔC_T of the test strains were normalized to the ΔC_T of the calibrator:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T(\text{test}) - \Delta C_T(\text{calibrator})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation $= (2^{-\Delta \Delta C_T})$: Normalized expression ratio

APPENDIX

البيانات لجينات الخلايا المزروعة

Gene name and GenBank Code	Forward primer	Reverse Primer	Tm °C
Collage I NM_000088.3	COLI-F-5- CCTGGATGCCATCAAAGTCT-3	COLI-R-5- GAATCCATCGGTCATGCTCT-3	55
Fibronectin-1 NM_002026.2	FN1-F-5- CAGTGGGAGACCTCGAGAAG-3	FN1-R-5- CACTGTGACAGCAGGAGCAT-3	57
Beta actin NM_001017992. 3	Bactin-F-5- CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3	Bactin-R-5- AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3	55

المصادر

References

❖ لمصادر العربية

- الجميل, رنا رياض (2002). دراسة أعراض متلازمة تكيس المبايض لدى نساء العراق، رسالة ماجستير.
- الراوي، خاشع محمود 2000. مدخل الى الاحصاء. الطبعة الثالثة، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة البصرة: 30-31.
- السعدي ، ريم عبد الرحيم مردان (2012) تأثير إزالة المبايض وفرط الحديد على بعض المعايير الفسلجية والوراثية في إناث الأرانب البالغة. رسالة ماجستير. كلية التربية للعلوم الصرفة. جامعة كربلاء.
- العلوجي, صباح ناصر (1989). هرمونات الغدد الصم والغدد التناسلية, دار الفكر للطباعة والنشر, عمان, الاردن .
- العلوجي, صباح ناصر (2005). هرمونات الغدد الصم والغدد التناسلية, دار الفكر للطباعة والنشر, عمان, الأردن .
- غايتون وهال, (2004). المرجع في الفزيولوجيا الطبيعية . دار المنجد . قسم النشر الطبي: 235 .
- الكنانى, انتصار رحيم , الخفاف , أسرار إسماعيل (2006) . قابلية بيروكسيد الهيدروجين على إحداث الإجهاد التأكسدي ونشوء أفات التصلب العصيدي مع دراسة تأثير بعض مضادات الأكسدة المتمثلة بالاستراديول وفيتامين هـ والثوم الطازج في اناث الجرذان المستأصلة المبايض ,المجلة العراقية البيطرية ,المجلد 21 , 1 (93-110).
- ميرك, الموسوعة الطبية الميسرة (1996), (ميرك. التشخيص والمعالجة), الطبعة الاولى: الجزء الثاني, ترجمة حسان احمد قمحية، المركز التقني المعاصر. دار ابن النفيس، ص.2112.

❖ المصادر الاجنبية

- 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 .
- Allani , I. (1974). Measurment of cholesterol . Clin. Chem. ;20:470-475.
- 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.
- 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.
- 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.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL,Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC,DuBose RF, Cosman D, Galibert L 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growthand dendritic-cell function. Nature; 390:175-179.

- Arsalan, H., A. Ketani, A. Gezici, A. Kapukaya and S. Necmioglu et al., 2003. The effects of osteoporosis on distraction osteogenesis: An experimental study in an ovariectomized rabbit model. *Acta Orthop. Belg.*, 69: 67-73.
- Aspray T.J., L. Yan and A. Prentice(2005): Parathyroid hormone and rates of bone formation are raised in perimenopausal rural Gambian women. *Bone*, 36(4): 710-720.
- 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.
- 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.
- Battle D.C. (1986).Characterization of defects in collecting tubule acidification.*kidney Int.*30:546-54.
- Blair HC, Jordan SE, Peterson TG & Barnes S (1996) Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 61, 629-637.
- Bojrab ,M.J. (1998) .*Current Techniquws in Small Animal Surgery* (4th ed.) Lippincott Williams and Wilkins. Pp .790.
- Boling EP. Secondary osteoporosis: underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Ther.* 2004;26:1-14.
- 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.
- Bray ,JJ.;Cragg, PA. ;Macknight,AC.;& Mills, RG. (1999).Lecture notes Effects of alcohol ingestion on estrogens in postmenopausal.
 - Britt ,K.&Findlay , J. (2002). Estrogen actions in the ovary revisited .*J. Endocrinol.* ; (175) :269-276.
 - Brustelin ,S; Gugliani R;Falix, T (2010): Genetic of homocystein metabolism and associated disorders . *Brasilian jurinal of medical and Biological Research* ;(43)1-7.
 - Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J,Capparelli Scully S, Tan HL, Xu WL, Lacey DL,Boyle WJ, Simonet WS 1998 . Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*; 12:1260-1268.
 - Buencamino, M.C.A.; Sikon, A.L.; Jain, A.; Thacker, H.L. An observational study on the adherence to treatment guidelines of osteopenia. *J. Women’s Health* 2009, 18, 873–881.
 - Bulkley, G. B. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*. 94 (3): 407-411.
 - Burstein ,M. J. (1970). Measurement of HDL .*Lipid Res.*, 11:583.
Blair HC, Jordan SE, Peterson TG & Barnes S (1996) Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 61, 629-637 .
 - 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.

- Canalis, E.; Giustina, A.; Bilezikian, J.P(2007). Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 357, 905–916.
- Cannell, B.(1998): How to approach the isolation of natural products, 1st end. Human press. Inc.
- Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997; 337:91-95.
- Caroline Jochems, Ulrika Islander, Malin Erlandsson, Margareta Verdrengh, Claes Ohlsson and Hans Carlsten ; (2005) :Osteoporosis in experimental postmenopausal polyarthritis: the relative contributions of estrogen deficiency and inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 7:R837-R843 doi:10.1186/ar1753.
- 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.
- Cesnjaj, M., A. Stavljenic and S. Vukicevic, 1991. Decreased osteoinductive potential of bone matrix from ovariectomized rats. *Acta. Orthop. Scand.*, 62: 471-475 Cassidy A (1996) Breast cancer: weighing up the dietary evidence. *Breast*, 5, 389-397.
- Chadwick LR, Nikolic D, Burdette JE, Overk CR, Bolton JL, van Breemen RB, Fröhlich R, Fong HH, Farnsworth NR, Pauli GF (December 2004). "Estrogens and congeners from spent hops (*Humulus lupulus*)". *Journal of Natural Products* 67 (12): 2024–2032.
- Chaudiere, J.; Ferrari-Illiou, R(1999). Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 949–962.

- 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.
- Chen XW, Garner SC, Anderson JJ 2002. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen - receptordependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; 295:417-422.
- 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.
- Corboz VA, Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, van der Pluijm G, Lowik CW 1992 . Effect of macrophage colony stimulating factor on in vitro osteoclast generation and bone resorption . *Endocrinology*; 130:437-442.
- Corboz VA, Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, van der Pluijm G, Lowik CW 1992. Effect of macrophage colonystimulating factor on in vitro osteoclast generation and bone resorption. *Endocrinology*; 130:437-442.
- Coxam V. (2005): New advances in osteoporosis nutritional prevention. *Med Sci (Paris)*. 21(3):297-301.
- Dabbagh , A.J. ; Shwaery ,G.T. ; Keaney , J.F. & Frei, B. (1997) Effect of iron overload and deficiency on atherosclerosis in the hyper-Cholesterole micrabbt Arterioscler . *Thromb Vase .Biol.* , 17 :2638-2645.

- Dang ZC (May 2009). "Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action". *Obes Rev* 10 (3): 342–9.
- Dang ZC, Lowik C (July 2005). "Dose-dependent effects phytoestrogens on bone". *Trends Endocrinol. Metab.* 16 (5): 207–13.
- Danil Zohary and Marria Hopf 2000.(Domestication of plants in the old world).114 ed. Philadelphia v: Elsevier .Science .
- Davis SR, Murkies AL, Vilcox G. Phytoestrogens in clinical practice. *Integr Med* 1998; 1:27-34.
- Duffy R, Wiseman H, File SE 2003: Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones. *Pharmacol Biochem Behav*, 75:721-729.
- Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD 2000. Oral statins and increased bone mineral density in postmenopausal women . *Lancet*;355:2218-9.
- 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.
- Erdman JW Jr. AHA Science Advisory: Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation* 2000; 102:2555-9.
- Ernst M, Rodan GA 1991. Estradiol regulation of insulinlike growth factor-1 expression in osteoblastic cells:evidence for transcriptional control. *Mol Endocrinol*; 5:1081-1089.
- Evans RM 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*; 240:889-895.

- FAD 1999. Food labeling health claims: soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration. Final rule. Fed Regist. 64:57700-33.
- Fair D.S. and Krassner S.M. (1971): J. Protozod., 18, 441.
- Fang, H.; Tong, W. ; Shi, L. ; Blair, R.; Perkins, R. ; Branham, W. ; Hass, B.; Xie, Q.; Dial, S.; Moland, C.; Sheehan, D.; (2001). Structure
- 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.
- Ferreira, M.F.; Sobrinho, L.G.; Pires, J.S. et al. "Endocrine and Psychological evaluation of women with recent weight gain" Psychoneuroendocrinology; (1995) 20 (1): 53-63.
- Flores, A. ; Gallegos, A.I. ; Velasco, J.; et al. (2008). The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, and environmental estrogens Chem. Res. Toxicol. ; 14 (3): 280-94.
- Folsom, A.R.; McGovern, P.G.; Nambursh, A.A.; et al. (1996) Change in plasma lipids and lipoproteins associated with starting or stopping postmenopausal hormone replacement therapy. Atherosclerosis risk in communities study. Am. Heart. J.; 132: 925-958.
- Frenay M, Milano G, Formento JL, Francoval M, Moll JL, Namer M. 1991. Oestrogen and progesterone receptor status in bone biopsy specimens from patients with breast cancer. Eur J Cancer; 27:115-118.
- 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.,

- Ganon W.(1997):Review of medical physiology.18th ed.USA.P437.
- Gass M, Dawson-Hughes B. (2006) :Preventing osteoporosis-related fractures: on overview. Am J Med.;119:3S-11S.
- 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.
- Gibbs RB: Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. Neurobiol Aging 2000, 21:107-Gilsanz, V., T.F. Roe, D.T.
- Ginsbury ,E.S. ; Mellon , N.K. ; Mendelson , J. H. ; Barbieri , R. ; Teoh , S.K. ; Rothman , M.; Gao , X. ; & Sholar , J. W. (1996) Activity relationships for alarge diverse set of natural ,synthetic Heifers . AJ. Endocrinol. ; (190) : 819 -827.
- Gomez-Zubeldia, M.A., Hernandez, R., Viguera, J., Arbues, J.J., Aparicio, A. and Millan, J.C. (2000). Effect of bilateral ovariectomy and ovarian steroid hormones on the antioxidant systems and plasma malondialdehyde levels in wistar rats. Endocr-Res., 26: 97-107.
- Guyton ,AC . & Hall, JE. (2006). Text book of medical physiology 11th
- 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.
- Halliwell, B. (1993).The role of oxygen radicals in human disease with particular reference to the vascular system.Haemostasis23:118-126.164.
- 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 ovariectomised

- female albino rats subjected to myocardial infarction . Singapore Med J; 51(10) : 781.
- Hammond CB: Women's concerns with hormone replacement therapy-compliance issues. Fertil Steril 1994, 62:157S-160S.
 - Hankenson K.D., I.E. James, S. Apone,G.B. Stroup, S.M. Blake, X. Liang,M.W. Lark and P. Bornstin (2005):Increased osteoblastogenesis and decreased bone resorption protect against ovariectomy-induced bone loss in thrombospondin-2-null mice. Matrix Biolo. 24(5):362-370.
 - Hansen LB, Vondracek SF. (2004);Prevention and treatment of nonpostmenopausal osteoporosis. Am J Health-Syst Pharm. 61:2537-56.
 - Heaney, R.P.; Recker, R.R.; Saville, P.D. Menopausal changes in bone remodeling. J. Lab. Clin.Med. 1978, 92, 964-970.
 - Hickey ,M.;Davis, SR. & Sturdee ,DW. (2005). Treatment menopausal symptoms :what shall we do now ?.Lancet .366:
 - Higuchi ,Y. (2004).Glutathion depletion -induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and Neerosis .J. Cell Mol. , 8(4):455-464.
 - Hsu YH,Chen WY,Chan CH,Wu CH,Sun ZJ,&Chang MS(2011).Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against osteoporotic bone loss. The Journal of experimental medicine,208(9),1849-61.
 - 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.

- Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nature Medicine* 1996;2:1132-1136.
- Humaidan ,P. (2004) .Effectof recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist Down -regulation and stimulation with recombinant FSH : An opening study .*Rev.Bio .Med. Online .*;8 (6) :635- 643.
- Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A, Ikegami S 2000 Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice.
- Ishimi Y, Miyaura C, Him CH, Akatsu T, Abe E,Nakamura Y, Yamaguchi A , Yoshiki S, Matsude T,Hirano T, Kishimoto T, Suda T (1990). Il-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*; 145:3297-3303.
- 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.
- 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.
- Jovanovic,J. and jovanovic, M.(2004).Lipid disturbance at workers professionally exposed to industrial noise. *JugoslovenskaMedicinkaBiohemija*, 23(1): 69-73.
- 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 .

- Kamsiah, J., S. Nik Aziz, M.A. Imran, O. Azizah and J.Buddy, 2004. Changes in serum lipid profile and malondialdehyde following consumption of fresh or heated soya oil. *Malaysian J. Biochem. Molec. Biol.*,9: 1-6.
- Kaplan M.M.,(1972):*New England J.Med.*286:200. Korhonen, S. ; Hippelinen , M.;Niskanen,L.et al.2001).Relationship of the metabolic syndrome :A controlled ,population-based study.*Am J.Obstet.Gynecol.*184:289-6.
- Karamifar ,H.;Shahriari ,M.& Amirhakimi ,G. (2005). Failure of puberty and linear Growth in Beta –thalassemia Major .*Turk.J. Haematol.* ;22(2):65-69.
- 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 .
- 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 .
- 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 .
-
- Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S 1999. Promoter structure of mouse *RANKL/TRANCE/OPGL/ODF* gene. *BiochemBiophys Acta*; 1445:134-141.

- Knight DC & Eden JA (1995) Phytoestrogens - A short review. *Maturitas*, 22, 167-175.
- Koh JM, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY, Lee KU, Kim GS. (2006) Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation *J Bone Miner Res.* Jul;21(7):1003-11.
- Kojima, M., Masui, T., Nemoto, K. and Degawa, M.(2004). Lead nitrate induced development rats: sterol. Independent gene regulation Of hepatic cholesterol homeostasis. *Toxicol. Lett.*, 154:35-44.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*; 397:315-323.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM 1999 . OPGL is a key
- Korhonen, S.; Hippelinen, M.; Niskanen, L. et al(2001) "Relationship of the metabolic syndrome: A controlled, population- based study" *Am J. Obstet. Gynecol.*; 184:289-6.
- Krassas G.E. and Ph. Papadopoulou 2001 Oestrogen action on bone cells. *J Musculoskel Neuron Interact*; 2(2):143-151.
- Kubo, T., T. Shiga, J. Hashimoto, 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 .
- Kuiper ,1998.(interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogen with estrogen receptor beta).*Endocrinology*.Oct.139(10):4252-36.
 - Kuiper GGJM & Gustafsson JA (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: Potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *Febs Lett*, 410, 87-90.
 - Kurachi ,H.;Adachi , H. ; Ohtsuka , S. ; Morishige , K. ; Amemiya ,K.; Keno ,Y. ;Shimomura , I.; Tokunaga , K.; Miyake ,A.& Tanizwa O. (1993) . Involvement of epidermal growth factor in inducing Obesity in overiectomized rats .*Am. J. Physiol.*; 265 :323-331.
 - Kusec V, Viridi AS, Prince R, Triffitt JT. Localization of estrogen receptor-a in human and rabbit skeletal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2421-2428.
 - Lane, D.E. (2006)"Polycystic ovary syndrome and its differential diagnosis" *Obstet. Gynecol. Surv.*; 61(2) : 125-35.
 - 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*.
 - Laura Mc Ginnis and Jan Suszkiw,ARS. , 2006.(Breeding better beans) *Agricultural Research magazine* .June 2006.
 - Levasseur R. (2009): Bone tissue and hyperhomocysteinemia . *Joint Bone Spine*. 76(3):234-40.
 - 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 .
- Lindberg MK, Erlandsson M, Alatalo SL, Windahl S, Andersson G, Halleen JM, Carlsten H, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor α , but not estrogen receptor β , is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF- κ B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *J Endocrinol* 2001; 171:425-433.
 - Liu CC, Howard GA 1991 . Bone-cell changes in estrogen induced bone mass increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. *Anat Rec*; 229:240-250.
 - Liu RH, Werth VP.(2007)What is new in the treatment of steroid-induced osteoporosis? *Semin Cutan Med Surg*; 26: 203-209 .
 - Livak, K., J., and Schmittgen, T., D., (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25 402-410.
 - Lorenzo JA, Sousa SL, Fonseca JM, Hock JM, Medlock ES 1987. Colony stimulating factors regulate the development of multinucleated osteoclasts from recently replicated cells in vitro. *J Clin Invest*; 80:160-164 .
 - Mabuchi M.(1996). Pharmacological intervention and LDL of faulical hypercholesterolemia. *A.P.J.C.N.*, 5(4), 4-7.
 - 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.

- Manolagas SC, WEINSTEIN RS(1999): Perspective:New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis.J Bone Miner Res; 14: 1061-6 .
- 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.
- Manolagas SC 2000. Birth and death of bone cells: Basicregulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev; 21:115-137.
- Manolagas SC, Jilka RL, Bellido T, O'Brien CA, Parfitt AM 1996. Interleukin-6-type cytokines and their receptors.In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, CA;:701-713.
- 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 .
- Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. (2006)Glucocorticoid-induced osteoporosis an update. Trends Endocrinol Metab; 17: 144-149 .
- McNamara, L.M.; Ederveen, A.G.H.; Lyons, C.G.; Price, C.; Schaffer, M.B.; Weinans, H.;Prendergast, P.J 2006. Strength of cancellous bone trabecular tissue from normal, ovariectomized and drug-treated rats over the course of ageing. Bone, 39, 392–400.
- Mechanick, J.I., Pomerantz, F., Flanagan, S., Stein, A., Gordon , W.A. & Ragnarsson, K.T. (1997) Parathyroid hormone suppression in spinal cord injury patients is associated with the degree of neurologic impairment and not the level of injury. Archives of PhysicalMedicine and Rehabilitation, 78, 692–696.

- Mechoulam ,R.; Brueggemeier,R.; Denlinger ,D.(2005) .Estrogens in insects . Cellular &Molecular life Sci. ; 40 (9): 942-944.
- Melton LJ III, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW,Riggs BL. (1992) perspective. How many women have osteoporosis J Bone Miner Res; 7:1005-1010.
- Mendelsohn ,M. & Karas , R. (1999). The Protective Effects of Estrogen on The Cardiovascular Syatem . Massachsetts Medical. Society.;340 (23): 1801-1811 .
- 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.
- Messina M (1995) Isoflavone intake by Japanese were overestimated. Am J Clin Nutr, 62, 645 .205 .
- Messina M, Redmond G 2006. Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature. Thyroid; 16:249-58 .
- Meyer ,M. ; Capuco ,A.; Boisclair ,Y. &Van Amburgh , M. (2006). Estrogen– dependent responses of the prepubertal dairty Menopause .Int. ; 14(3):111-16 .
- Michael ,S.(2007).Iron overload cardiomyopathy .Associated with iron overload conditions health .J. ;11(3):1-6 .
- Miner. Res., 21: 466-467. Lawrence, R.A.; Burk, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.Biochem. Biophys. Res.Commun. 1976, 71, 952–958.
- Mohan S, Baylink DJ(1991). The role of IGF-1 in the coupling of bone formation to resorption. In: Spencer EM (ed)Modern

- Concepts of Insulin-Like Growth Factors. Elsevier, New York;:169-184 .
- Moran de Brito, C.M., Battistella, L.R., Saito, E.T. & Sakamoto, H.(2005) Effect of alendronate on bone mineral density in spinal cord injury patients: a pilot study. *Spinal Cord*, 43, 341–348 .
 - Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K . Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3689-3698 .
 - 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.
 - Nelson ,H.(2008) .Menopause .*Lancet* . 371 :760-770.-Shuster ,L.;Gostout ,B. ; Grossardt , B.&Rocca, W.(2008).Prophylactic oophorectomy in premenopausal women and long-term health .
 - 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 .
 - Norman A.W.;Mircheff A.K. and Adams T.H. (1970): *Biochem . Biophys .Acta*,251,343 .
 - Ohashi T, Kushuhara S, Ishida K 1990. Histochemical identification of oestrogen target cells in the medullary bone of laying hens. *Br Poult Sci*; 31:221-224 .
 - Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T(1997).Expression of estrogen receptor-, in rat bone.*Endocrinology*; 138:4509-4512 .
 - Oursler, M. J., J. P. Landers, B. L. Riggs, and T. C. Spelsberg.1993. Estrogen effects on osteoblasts and osteoclasts. *Ann. Med* .

- Parker, W. ; Jacoby , V.; Shoupe , D. & Rocca , w. (2009) . Effect of bilateral oophorectomy on women's long - term health . Womens health (Lond Engl) . ; 5 (5): 565-76.
- Parker,W. (2010). Bilateral oophorectomy versus ovarin conservation :effects on lung – term woman' s health. J. Minim Invasive Gynecol. ;17 (2):161-66 .
- Pennisi P, Trombetti A, Rizzoli R(2006.) Glucocorticoid- induced osteoporosis and its treatment. Clin Orthop Relat Res.;443:39-47.
- Petilli M, Fiorelli G, Benvenuti S, Frediani U, Gori F & Brandi ML (1995) Interactions between ipriflavone and the estrogen receptor. Calcif Tissue Inter, 56, 160-165.
- 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 .
- Prasanthi J R P, Larson T, Schommer J, Ghribi O,(2011) Silencing GADD153/CHOP Gene Expression Protects against Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by 27-Hydroxycholesterol in Rabbit Hippocampus Free Radic Biol Med 49:
- Presnell,J.&Schreibman , M.(1997). Humason's animal tissue techniques , 5th ed .John Hopkins .Univ. Press , Balfimore ,596 .
- Reame NE, Lukacs JL, Olton P, Ansbacher R, Padmanabhan V, 2007 Differential effects of aging on activin A and its binding protein, follistatin, across the menopause transition . Fertil Steril 88: 1003-1005.

- 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 .
- Resnick SM, Metter EJ, Zonderman AB: Estrogen replacement therapy and longitudinal decline in visual memory. A possible protective effect? *Neurology* 1997, 49:1491-1497.
- Rober-Gayon,P.R(1972):Plant phenolic.Oliver and Boyd . Edinburgh . 254 pp .
- 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.
- Ross PD (1996) *Osteoporosis. Frequency, consequences, and risk factors* . *Arch Intern Med* 156:1399–1411 .
- Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T 2001. 17,-Estradi stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor - . *Endocrinology*; 142:2205-2212 .
- Sasaki N, Kusano E, Ando Y, Yano K, Tsuda E, Asano Y 2001 . Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin(OPG): possible mechanism for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant*; 16:479-482 .
- Schwatz ,P. (1992).The role of prophylactic oophorctomy in the avoidance of ovarian cancer . *Int . J . Gynaecol .Obster* .;39(3):175-84.
- Seshadri,.N.and Robinson.(2000).Homocysteine ,B vitamin and coronary artery disease .*Med .Clin. North.Am.*, 84(1):215- 237.

- Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:7829-7834 .
- 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.
- Sreelathakumari ,K.; Menon , V. & Leelamma ,S.(1993). Lipid peroxidw metabolism in oophorectomised rat . Indian .J. Med.Res. ; 98 :305-308 .
- Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R(2001). Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-B ligand (RANKL)- induced JNK activation. J Biol Chem;276:8836-8840 .
- 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 .
- 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 hearts Acta Physiologica Sinica, 57 (3): 373-378
- Teitelbaum SL 2000. Bone resorption by osteoclasts. Science ; 289 : 1504-1508 .

- Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ 1987. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol*; 138:775-779 .
- Tian ,H. ;Liang ,J.&Zhang ,X. (1991).Malondialdehyde - modified low density lipoprotein in diabetes mellitus .*Hua .I.Ko.Ta.Hsueh PAO .*; 22:97-99 .
- Townsend ,D.;Tew ,K.&Tapiero ,H.(2003).The importance of glutathione in human disease . *Biomed . Pharmacotherapy (57):145-155 .*
- 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 .
- Turner AS (2002) The sheep as a model for osteoporosis in humans . *Vet J* 163:232–239.
- 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 .
- Turner RT, Backup P, Kline BC, Colvard DS, Spelsberg TC 1991. Evidence that the inhibition of osteoblast activity by estrogen is preceded by down regulation of IGF-1 gene expression and that these changes are estrogen receptor mediated. In: Spencer EM (ed) *Molecular concepts of insulin-like growth factors*. Elsevier, New York;:143-153 .
- Turner RT, Backup P, Kline BC, Colvard DS, Spelsberg TC1991. Evidence that the inhibition of osteoblast activity by estrogen is preceded by down regulation of IGF-1 gene expression and that these changes are estrogen receptor mediated. In: Spencer EM

- (ed) Molecular concepts of insulin-like growth factors. Elsevier, New York;:143-153 .
- Turner RT, Riggs BL, Spelsburg TC 1994. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev*; 3:275-300 .
 - Turner, S.A., 2001. Animal models of osteoporosis necessity and limitations. *Eur. Pean Cell Mater.*,1: 66-81 .
 - United Nations ,FAO ,1994.(Definition and Classification of commodities.Women .*J. Amer. Medical Associa.* ;276: 1747 – 1751.
 - Vanned HK, Laitala-Leinonen T.(2008):Osteoclast lineage and ;function. *Arch Biochem Biophys.*
 -
 - Vale W, Wiater E, Gray P, Harrison C, Bilezikjian L, Choe S, 2004 , Activins and inhibins and their signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1038: 142-147 .
 - 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 17 β - estradiol .. *Circulation*; 103: 258-262 .
 - Wang JF, Guo YX, Niu JZ, et al. Effects of Radix Puerariae flavones on liver lipid metabolism in ovariectomized rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1967-70 .
 - Wang, G., and Hardy., MP., (2004). Development of leydig cells in the insulin- ike growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation . *Biol Reprod.* 70:632–639.

- Weitzmann ,M.&Pacifci ,R. (2006). Estrogen deficiency and bone loss :an inflammatory tale . J.Clin .Invest . ;116 (5):1186-1194 .
- Whitehead ,S.&Nussey ,S.(2001).Endocrinology :an intergrated approach .Oxford :BIOS :Taylor & Francis .ISPN. 1-85996 -25-1 .
- Wilcox G, Wahlqvist ML, Burger HG & Medley G (1990) Oestrogenic effects of plant foods in postmenopausal women. BMJ, 301, 905-906 .
- Wohaieb ,S.; Tohala ,S.&AL-Dewachi ,D. (1994).Effect of induced . Iraq .J. Vet.Sci .; 7 :81-84 .
- Xie F., C.F. Wu, Y. Zhang, et al. (2005):Increase in bone mass and bone strength by Sambucus williamsii HANCE in ovariectomized rats. Biol. Pharm. Bull. 28(10): 1879-1885 .
- Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H 2001. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis . Endocrinology;142:3632-3637.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K,Kinoshaki M , Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M,Murakami A, Tsuda E, Morinaga T,Higashio K,Udagawa N, Takahashi N, Suda T 1998. Osteoclast differentiation fac is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis - inhibito factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA;95:3597-3602 .
- Yazigi ,A. ; Maalout ,G. ;Khoriaty ,A.;Tamim ,H.&Saab ,C. (2002). Bone mineral density in β -thalassemic Lebanese children. J.Musculosked .Neuron .Interact ,2 (5):463-468 .

-
- Yen ,S. ;Jaffe , R.; Barbieri ,R. (1999).Reproductive endocrinology .4th ed . Philadelphia :Saunders . 110-133 ;301 -319;751-784 .
 - Yildiz, Fatih (2005). Phytoestrogens in Functional Foods. Taylor & Francis Ltd. pp. 3–5, 210–211. ISBN 978-1-57444-508-4 .
 - Young ,I.S. and Woodside J.U.(2001).Antioxidant in health and disease .J .Clin.Pathol.,54:170-186 .
 - 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 in August.
 - Zaidi M, Blair HC, Iqbal J, et al, 2009 New insights: elevated follicle-stimulating hormone and bone loss during the menopausal transition. Curr Rheumatol Rep 11: 191-195 .
 - Zhou, X.J., Vaziri, N.D., Segal, J.L., Winer, R.L., Eltorai, I. & Brunnemann , S.R. (1993) Effects of chronic spinal cord injury and pressure ulcer on 25(OH)-vitamin D levels. Journal of the American Paraplegia Society, 16 , 9–13 .

Summary

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 cells through the study of some physiology parameters in female rabbits induced by Osteoporosis by bilateral removal of the ovaries.

In addition to study the resulting changes in the genetic material of genes Fibronectin and Collagen Type I and future Receptor for activation of nuclear factor kappa B (RANK) in artificial (in vitro) and within the body of the organism (in vivo) in bone cell.

After extraction plant estrogens from white beans , then extract the effective doseED50. Designed an experiment to find effective dose ED50 estrogenic plant and that by the distribution of random for 80 female rabbits into six groups (8 / group) were injected first group saline solution and used a control (G) with injected intramuscularly second group 0.07 mg / kg of plant estrogens (G1) and the third 0.1 mg / kg (G2) and the fourth 0.2 mg / kg ((G3) and the fifth 0.5 mg / kg (G4) and sixth 0.7 mg / kg (G5) daily for four weeks . then was measured some occupational standards (such as total Cholesterol (TC), high lipoprotein density (HDL), Malondialdehyde (MDA) and Glutathion (GSH) and identified the effective dose was 0.2 mg / kg.

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- :

-1-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 of the follicle-stimulating hormones ((FSH and LH and the level of 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.

-2- 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 FSH and LH and MDA and Ca and ALP compared with the group removed the ovaries G2.

-3- 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.

-4- 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 and As for the tissue of the uterus Dissociation of the layers interior of the uterus and low in nutrition uterine and reduction in lymph uterine group of female removed the ovaries . while when injection the effective dose of phytoestrogen observed lack of deterioration of bone tissue and the uterus.

-5- Study results showed the genetic control of gene expression of genes clearly higher Collagen type I and Fibronectin group of animals removed ovaries , treatment and injected without removal of the ovaries . while results did not show significant differences for the future of the genes Receptor for activation of nuclear factor kappa B (RANK).

As for the second part of the study , which includes the study of biological activity of the cells of the bone after treatment estrogen plant , was estimated concentration of estrogen affecting the vital cell of bone and using concentrations upward (12.5 0.25 50, 100 200 400 , micrograms / ml) for a period of 24.48 0.72 hours. concentration of 50 micrograms found 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 . Either to study 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 that work on the adhesion of bone cells to Article interfaces Fibronectin and that these genes reduces the process of programmed cell death.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Kerbala /College of Education For Pure Sciences
Department of Biology



Effect of phytoestrogen in some functional and histological and genetic parameters in the female rabbits which induced osteoporosis

A Thesis Submitted
to the Council of College of Education For Pure Sciences
University of Karbala in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in
Biology/ animal science

BY

Ghusoon kaneam kaem

M. SC. Biology- Karbala University 2005

Supervised by
Assistant Prof. Dr. Wefak Jabory
Dr. Hssain Alawan

2014 A. C.

1435 A. H.