

The role of Exenatide-GLP-1 receptor agonist- in the prevention and treatment of ovariectomy-induced osteoporosis in wistar rats

Loujain Ghassan Sallat

Marwan Abdo Khattab

Mahmoud Kasem Kasem

Faculty of Sciences || University of Aleppo || Syria

Abstract: The present study aimed to investigate the protective and therapeutic effect of Exenatide on osteoporosis induced by ovariectomy in female Wistar rats. The results of this study showed that administration of Exenatide at a dose of 10 mg/kg daily for 4 months led to a reduction in osteoporosis symptoms in ovariectomized rats, which was manifested by changes in serum levels of bone metabolism markers (a significant increase in the serum concentration of calcium, phosphorous, accompanied by a significant decrease in the potency of alkaline phosphatase), and a significant improvement in the tissue structure of the femur, in comparison with the members of the ovariectomized group.. We conclude from this study the effectiveness of Exenatide in reducing the adverse effects of ovarian hormone deficiency on both bone structure and function in female Wistar rats.

Keywords: Exenatide, osteoporosis, female wistar rats.

دور الأوكسيناتيد-ناهض مستقبل الببتيد الشبيه بالغلوكاغون-1- في العلاج والوقاية من هشاشة العظام المستحدثة باستئصال المبايض عند إناث جرذان ويستر

لجين غسان سلات

مروان عبده خطاب

محمود قاسم قاسم

كلية العلوم || جامعة حلب || سوريا

المستخلص: هدفت هذه الدراسة إلى تقييم التأثير الوقائي والعلاجي للأوكسيناتيد على هشاشة العظام المستحدثة باستئصال المبايض عند إناث جرذان ويستر. بينت نتائج هذه الدراسة أن إعطاء الأوكسيناتيد بجرعة 10 ميكروغرام/كغ يومياً لمدة 4 أشهر أدت إلى الحد من أعراض هشاشة العظام عند الجرذان مستأصلة المبايض وتجلت ذلك من خلال التغيرات في المستويات المصلية لواسمات الاستقلاب العظمي (زيادة معنوية في التركيز المصلي لكل من الكالسيوم والفوسفور، مصحوباً بانخفاض معنوي في فعالية إنزيم الفوسفاتاز القاعدي)، وتحسن ملحوظ في البنية النسيجية لعظم الفخذ، بالمقارنة مع أفراد المجموعة مستأصلة المبايض. نستخلص من هذه الدراسة فعالية الأوكسيناتيد في الحد من التأثيرات الضارة لنقص هرمون المبيض على كل من بنية ووظيفة العظم عند إناث جرذان ويستر.

الكلمات المفتاحية: الأوكسيناتيد، هشاشة العظام، إناث جرذان ويستر.

1- المقدمة.

يُعرف مرض هشاشة العظام Osteoporosis بالمرض الصامت فهو يصيب الإنسان لسنوات متعددة من دون الكشف عنه، ويتم تشخيص المصابين غالباً بعد حدوث الكسور العظمية، وهو من أكثر أمراض العظام الاستقلابية شيوعاً (Hasan *et al.*, 2013).

يُعد استئصال المبايض Overiectomized واحداً من أكثر العمليات الجراحية شيوعاً لدى النساء في جميع أنحاء العالم. ينتج عن استئصال المبايض خسارة تدريجية لكتلة العظام من خلال عملية مشابهة لما يحدث أثناء هشاشة العظام بعد انقطاع الطمث. في هذا الصدد، تم اعتبار نقص هرمون الاستروجين كسبب رئيسي لفقدان العظام (Hasan *et al.*, 2013).

يتميز هذا المرض بخلل وانحطاط في البنية الدقيقة للعظم نتيجة اضطراب في إعادة تشكل العظام الطبيعية التي تتضمن توازناً بين الارتشاف بواسطة الخلايا الهادمة للعظم Osteoclasts وإعادة البناء بواسطة الخلايا البانية للعظم Osteoblasts، مما يؤدي إلى إزاحة التوازن لصالح الارتشاف أكثر من التكوين العظمي، الأمر الذي يؤدي إلى تراجع كثافة العظم وتدهور في بنية النسيج العظمي مما يؤدي إلى كسور عظمية خاصة في منطقة عنق الفخذ والورك والفقرات (Hasan *et al.*, 2013).

يصيب مرض هشاشة العظام حوالي 200 مليون شخص في جميع أنحاء العالم، بما في ذلك 34% من النساء اللواتي تزيد أعمارهن عن 50 عاماً (Melissa *et al.*, 2012).

يشكل تأثير الأدوية المضادة لمرض السكري على استقلاب العظام اهتماماً متزايداً بسبب اكتشاف وجود علاقة بين داء السكري من النمط 2 وهشاشة العظام. تُعد ناهضات مستقبلات الببتيد الشبيه بالغلوكاغون 1 فئة جديدة وواعدة من الأدوية المضادة للسكري من النمط 2، والتي قد يكون لها أيضاً تطبيقات سريرية في اضطرابات أنسجة العظام (Zhao *et al.*, 2017).

الببتيد الشبيه بالغلوكاغون-1 (GLP-1) هو هرمون انكريتين incretin hormone تفرزه الخلايا L في الأمعاء بعد تناول الطعام، ينظم سكر الدم بشكل أساسي عن طريق تحفيز إفراز الأنسولين المعتمد على الجلوكوز (Bulchandani *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019). يُعد الأكسيناتيد ناهضاً قوياً لمستقبل GLP-1، وهو الشكل الصناعي من أكسيندين-4 Exendin-4 الذي تم اكتشافه في سم السحلية المعروفة باسم وحش جिला Heloderma suspectum (Yap & Misuan., 2019) يتألف من 39 حمضاً أمينياً، تم تطويره كعقار لعلاج مرض السكري من النمط 2 (Bulchandani *et al.*, 2012). كما أشارت بعض الدراسات الحديثة إلى آثاره الإيجابية على استقلاب العظام، بما في ذلك تعزيز كثافة المعادن في العظام وتحسين جودة العظام (Taleb *et al.*, 2020).

2- هدف البحث:

التحقق من التأثير الوقائي والعلاجي للأكسيناتيد في نموذج هشاشة العظام المستحدث باستئصال المبيض عند إناث جرذان ويستر، وذلك من خلال دراسة الخواص الفيزيائية والكيميائية الحيوية والنسجية لعظم الفخذ.

3- مواد وطرائق البحث.

1-3- حيوانات التجربة:

استخدم في هذه الدراسة 40 فرداً من إناث جردان ويستر، بعمر 6 أشهر، ووزن 190-220غ، تم الحصول عليها وتربيتها في البيت الحيواني التابع لكلية العلوم- جامعة حلب، ضمن شروط من التغذية والتهوية ودرجة الحرارة مع المحافظة على فترة ضوئية متعادلة (12/12) دورة ضوء/ظلام).

2-3- استحداث الإصابة:

تم التحريض على الإصابة بهشاشة العظام من خلال استئصال المبايض، وذلك محاكاةً لسن اليأس عند المرأة. حيث تم تخدير الحيوانات باستخدام مزيج من الكيتامين- زيلازين وأُجريت العملية تحت ظروف جراحية معقمة. بعد الجراحة وُضعت الحيوانات في الأقفاص بشكل إفرادي وأُعطيت مسكنات لتخفيف ألم الجرح والمضاد الحيوي (أوغمنتين)، مع تطهير مكان الخياطة باستخدام الأيودين.

3-3- الأكسيناتيد Exenatide:

تم استعمال دواء أكسيناتيد تحت المسمى التجاري (10µg) Byetta، إنتاج شركة AstraZeneca الأمريكية للصناعات الدوائية، وهو مستحضر سائل مُعد للحقن في محاقن مسبقة التعبئة، الشكل (1).



الشكل (1): دواء الأكسيناتيد Byetta

4-3- معاملة الحيوانات:

- قُسمت حيوانات التجربة إلى 4 مجموعات، في كل مجموعة 10 حيوانات وتمت معاملتها كالاتي:
 - المجموعة الأولى: المجموعة الجراحية الشاهدة (SHAM)، تكونت من 10 جردان خضعت لتدخل جراحي وهي حيث تم استئصال قطعة من الدهون حول المبايض فقط دون استئصال المبايض.
 - المجموعة الثانية: المجموعة مستأصلة المبايض (OVX) Ovariectomized، تكونت من 10 جردان خضعت لعملية استئصال المبيض وتُركت لمدة 4 أشهر حتى حدوث الإصابة.
 - المجموعة الثالثة (الموقاة بالأكسيناتيد): خضعت لعملية استئصال مبايض وفي اليوم التالي للعملية تم حقنها تحت الجلد بالأكسيناتيد 10µg/kg يومياً لمدة 4 أشهر، تم اختيار الجرعات الخاصة بالأكسيناتيد وفترة العلاج بناءً على البيانات السابقة في التجارب على الحيوانات (Ma et al., 2013).
 - المجموعة الرابعة (المعالجة بالأكسيناتيد): خضعت لعملية استئصال مبايض وتُركت لمدة 4 أشهر حتى حدوث الإصابة ثم تم حقنها تحت الجلد بالأكسيناتيد 10µg/kg يومياً لمدة 4 أشهر.

5-3 اختبارات الدم:

- تم سحب عينات الدم في نهاية التجربة من الجيب الحجاجي للعين بواسطة ماصات زجاجية دقيقة، وجمعت في أنابيب جافة.
- خضعت عينات الدم للتثفيل لمدة 15 دقيقة وبسرعة 3000 دورة في الدقيقة باستخدام جهاز الطرد المركزي للحصول على المصل.
- تم قياس المستويات المصلية لكل من الكالسيوم calcium والفوسفور phosphorous والكالين فوسفاتاز alkaline phosphatase (ALP) باستخدام العتائد المخبرية وبواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer.
- تم قياس مستويات هرمون الاستراديول Estradiol E2 باستخدام تقانة الاليزا ELISA.

6-3 الدراسة الفيزيائية:

- تم وزن أفراد المجموعات المدروسة وحساب الفرق بين أوزان الأجسام في بداية وفي نهاية التجربة، ثم سُرحت وغُزل عظم الفخذ الأيمن وحُزِر من الأنسجة الرخوة.
- وُزن العظم، وتم قياس الحجم باستبدال السوائل، ثم حساب الكثافة العظمية (الوزن/الحجم).
- قُدِّرت صلابة العظم باستخدام جهاز قياس الصلابة Hardness Tester الذي يقيس قابلية العظم لمقاومة الكسر.

7-3 قياس الكثافة العظمية المعدنية (Bone mineral density (BMD):

استُخدمت صور الأشعة ثلاثية الأبعاد المخروطية المقطعية CBCT Cone Beam Computed Tomography لتقييم الكثافة المعدنية لعظم الفخذ لجرذان كافة المجموعات المدروسة، وذلك بواسطة جهاز (Green CT, VATECH company, South Korai)، بحقل رؤية FOV 50 × 80 مم، حيث نحصل على مقطع شعاعي كل 80 μ m ميكرون، بقيمة كيلو فولت 93 KV، وبشدة تيار كهربائي 12.2 mA، وتم تحليل الصور باستخدام برنامج Ez3D-i software.

8-3 الدراسة النسيجية:

أُجريت الدراسة النسيجية على عينات عظم الفخذ بعد تثبيتها بمثبت فورمالين 10% ثم إزالة الكلس منها بواسطة حمض الأزوت 7% (93 مل فورمالين 10% أضيف إليه 7 مل من حمض الأزوت المطلق) لمدة 5 أيام، وتضمينها بالبارافين وتقطيعها باستخدام المقطاع المجهرى microtome من نوع (Thermo scientific GmbH) بسماكة 10 μ m وتلوينها باستخدام ملون (الهيماتوكسيلين-ايوزين) حسب طريقة (Harris-1900) وملون ماسون ثلاثي الألوان Masson's Trichrome.

9-3 الدراسة الإحصائية:

أُجريت الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج SPSS وباستخدام اختبار Independent Samples T Test لمعرفة إذا كان هناك فروق معنوية بين المجموعات المدروسة.

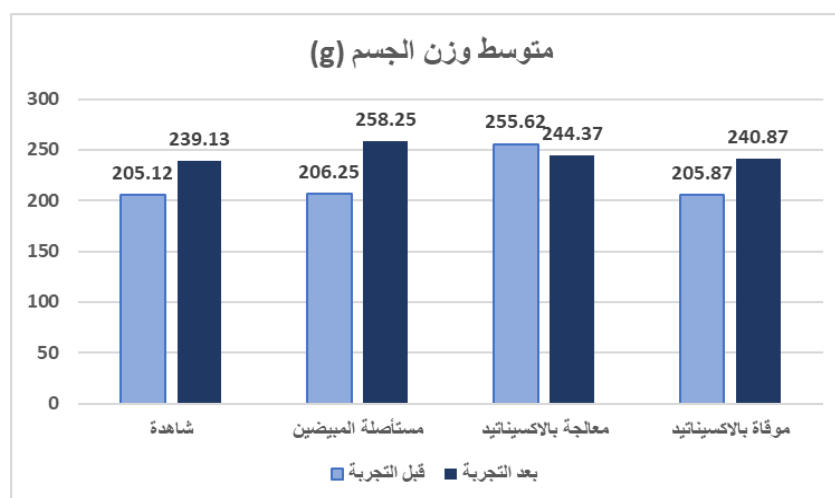
4- عرض النتائج ومناقشتها.

1-4 دراسة المعايير الفيزيائية

1-1-4. وزن الجسم: تم حساب أوزان أجسام الجرذان المدروسة قبل البدء بالتجربة وبعد الانتهاء منها، حيث لوحظ زيادة معنوية ($P=0.002<0.05$) في متوسط أوزان الأجسام بعد 4 أشهر من استئصال المبيض عند أفراد المجموعة OVX بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة SHAM، فيما يتعلق بأفراد المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد سواء في حالة الوقاية أو المعالجة فكان هناك انخفاض ملحوظ في متوسط وزن الجسم، رغم بقاء فارق معنوي عند مقارنته بالمجموعة الشاهدة حيث كانت القيمة الاحتمالية ($P=0.03<0.05$) عند المجموعة المعالجة و ($P=0.04<0.05$) عند مجموعة الوقاية، في حين كان التغير معنوي بين هذه المجموعات بالمقارنة مع المجموعة مستأصلة المبايض OVX والقيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$)، الجدول (1)، المخطط (1).

جدول (1) متوسط أوزان أجسام الحيوانات لدى المجموعات الأربعة

المجموعات	عدد الأفراد N	المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average± SD
الشاهدة، بداية التجربة	10	205.1±3.25
الشاهدة، نهاية التجربة		239.1±3.87
مستأصلة المبيضين، بداية التجربة	10	206.2±2.90
مستأصلة المبيضين، نهاية التجربة		258.2±2.76
الموقاة بالأكسيناتيد، بداية التجربة	10	205.8±3.09
الموقاة بالأكسيناتيد، نهاية التجربة		240.8±2.22
المعالجة بالأكسيناتيد، بداية التجربة	10	255.6±1.79
المعالجة بالأكسيناتيد، نهاية التجربة		244.3±1.86



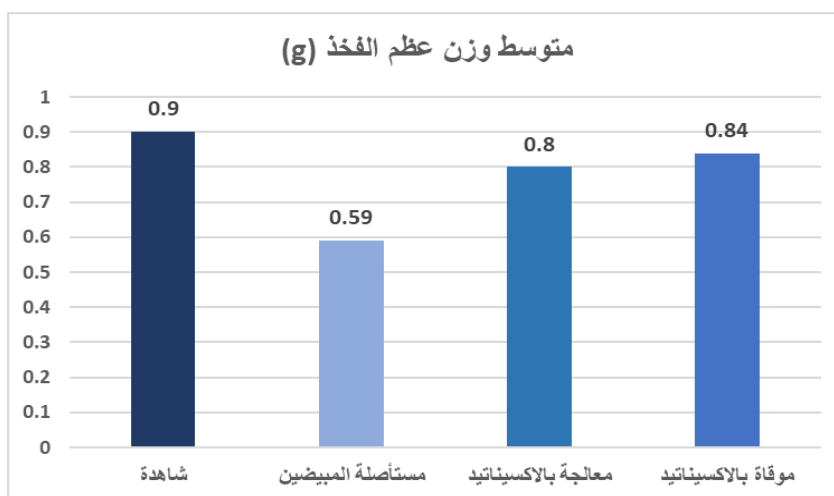
المخطط (1): يبين الفروق في متوسط وزن الجسم عند المجموعات الأربعة

4-1-2- وزن عظم الفخذ:

تم تحديد أوزان عظام الفخذ لأفراد المجموعات المدروسة عند الانتهاء من التجربة، ولوحظ انخفاض معنوي ($P=0.00<0.05$) في متوسط الأوزان عند مجموعة OVX مقارنة مع أفراد المجموعة الشاهدة SHAM، أما بالنسبة لأفراد المجموعات المعاملة بالأكسجيناتيد سواء في حالة الوقاية أو المعالجة فكان هناك ارتفاع ملحوظ في متوسط وزن العظم، رغم بقاء فارق معنوي عند مقارنته بالمجموعة الشاهدة حيث كانت القيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$) عند المجموعة المعالجة و ($P=0.00<0.05$) عند مجموعة الوقاية، في حين كان التغير معنوي بين هذه المجموعات بالمقارنة مع المجموعة مستأصلة المبيض OVX والقيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$)، الجدول (2)، المخطط (2).

جدول (2) متوسط وزن عظم الفخذ لدى المجموعات الأربعة

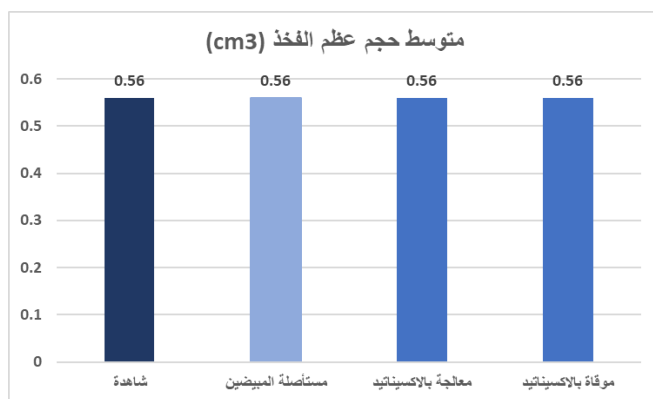
المجموعات	عدد الأفراد N	المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average± SD
الشاهدة	10	0.90±0.02
مستأصلة المبيضين	10	0.59±0.01
الموقاة بالأكسجيناتيد	10	0.84±0.02
المعالجة بالأكسجيناتيد	10	0.80±0.01



المخطط (2): يبين الفروق في متوسط وزن عظم الفخذ عند المجموعات الأربعة

4-1-3- حجم عظم الفخذ:

تم تحديد حجوم عظام الفخذ لأفراد المجموعات المدروسة عند الانتهاء من التجربة، ولم يُلاحظ أي تغير معنوي ($P=1.00>0.05$) في متوسط الحجوم لدى أفراد المجموعات الأربعة، الجدول (2)، المخطط (3).



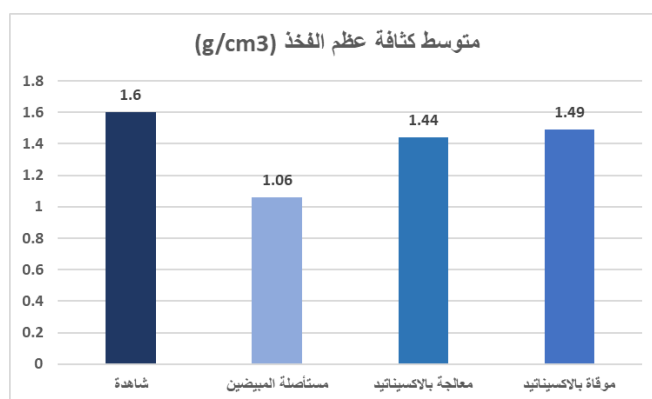
المخطط (3): يبين الفروق في متوسط حجم عظم الفخذ عند المجموعات الأربعة

4-1-4- كثافة عظم الفخذ:

لوحظ انخفاض معنوي ($P=0.00<0.05$) في متوسط الكثافة عند مجموعة OVX مقارنة مع أفراد المجموعة الشاهدة SHAM، فيما يتعلق بأفراد المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد سواء في حالة الوقاية أو المعالجة فكان هناك ارتفاع ملحوظ في متوسط كثافة العظم، رغم بقاء فارق معنوي عند مقارنته بالمجموعة الشاهدة حيث كانت القيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$) عند المجموعة المعالجة و ($P=0.00<0.05$) عند مجموعة الوقاية، في حين كان التغير معنوي بين هذه المجموعات بالمقارنة مع المجموعة مستأصلة المبايض OVX والقيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$). الجدول (3)، المخطط (4).

جدول (3) متوسط كثافة عظم الفخذ لدى المجموعات الأربعة

المجموعات	عدد الأفراد N	المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average ± SD
الشاهدة	10	1.60 ± 0.02
مستأصلة المبيضين	10	1.06 ± 0.03
الموقاة بالأكسيناتيد	10	1.44 ± 0.03
المعالجة بالأكسيناتيد	10	1.49 ± 0.02

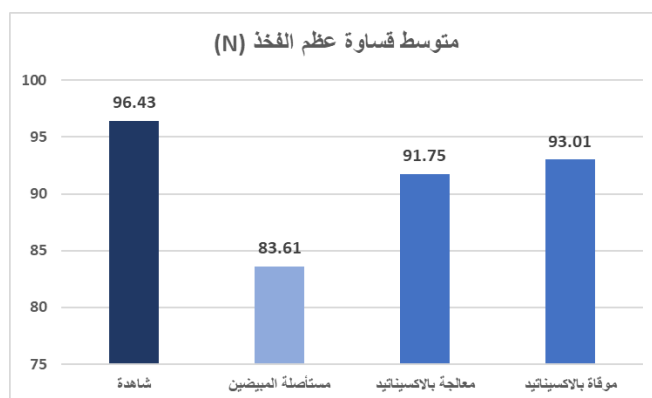


المخطط (4): يبين الفروق في متوسط كثافة عظم الفخذ عند المجموعات الأربعة

4-1-5- قساوة عظم الفخذ: تم تحديد قساوة عظام الفخذ لأفراد المجموعات المدروسة بقياس القوة اللازمة للكسر عند الانتهاء من التجربة، ولوحظ انخفاض معنوي ($P=0.00<0.05$) في متوسط قوى الكسر عند مجموعة OVX مقارنة مع أفراد المجموعة الشاهدة SHAM، فيما يتعلق بأفراد المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد سواء في حالة الوقاية أو المعالجة فكان هناك ارتفاع ملحوظ في متوسط قوة كسر العظم، رغم بقاء فارق معنوي عند مقارنته بالمجموعة الشاهدة حيث كانت القيمة الاحتمالية ($P=0.03<0.05$) عند المجموعة المعالجة و ($P=0.04<0.05$) فيما يتعلق بمجموعة الوقاية، في حين كان التغير معنوي بين هذه المجموعات بالمقارنة مع المجموعة مستأصلة المبيض OVX والقيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$)، الجدول (4)، المخطط (5).

جدول (4) متوسط قساوة عظم الفخذ لدى المجموعات الأربعة

المجموعات	عدد الأفراد N	المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average± SD
الشاهدة	10	96.43±0.25
مستأصلة المبيضين	10	83.61±0.10
الموقاة بالأكسيناتيد	10	91.75±0.14
المعالجة بالأكسيناتيد	10	93.01±0.10



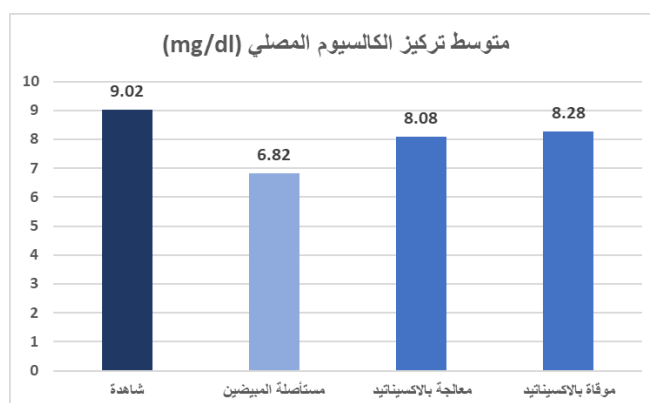
المخطط (5): يبين الفروق في متوسط قساوة عظم الفخذ عند المجموعات الأربعة

4-2- تغيرات المعايير المصلية العظمية بعد عملية إزالة المبيض:

4-1-1- قياس التركيز المصلي لشوارد الكالسيوم: لوحظ انخفاض معنوي (القيمة الاحتمالية $P=0.00<0.05$) في المعدل المصلي لشوارد الكالسيوم عند الحيوانات مستأصلة المبيض OVX في نهاية التجربة، بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة SHAM، فيما يتعلق بأفراد المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد سواء في حالة الوقاية أو المعالجة فكان هناك انخفاض ملحوظ في المعدل المصلي لشوارد الكالسيوم، رغم بقاء فارق معنوي عند مقارنته بالمجموعة الشاهدة حيث كانت القيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$) عند المجموعة المعالجة و ($P=0.00<0.05$) عند مجموعة الوقاية، في حين كان التغير معنوي بين هذه المجموعات بالمقارنة مع المجموعة مستأصلة المبيض OVX والقيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$)، الجدول (5)، المخطط (6).

جدول (5) متوسط تركيز الكالسيوم المصلي لدى المجموعات الأربعة

المجموعات	عدد الأفراد N	المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average± SD
الشاهدة	10	9.02±0.23
مستأصلة المبيضين	10	6.82±0.01
الموقاة بالأكسيناتيد	10	8.08±0.01
المعالجة بالأكسيناتيد	10	8.28±0.03



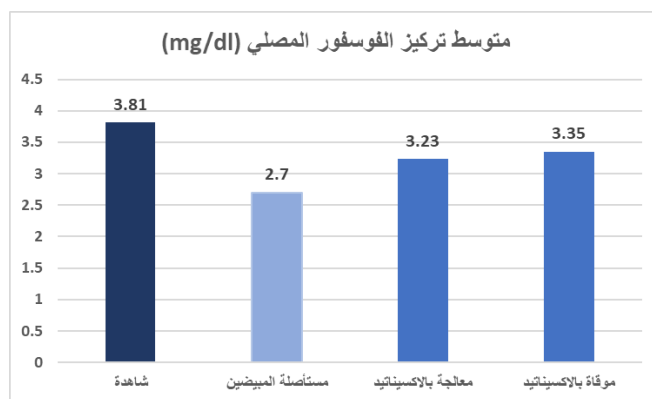
المخطط (6): يبين الفروق في متوسط تركيز شوارد الكالسيوم عند المجموعات الأربعة

2-1-4- قياس التركيز المصلي لشوارد الفوسفور:

نلاحظ انخفاض معنوي (القيمة الاحتمالية $P=0.00<0.05$) في المعدل المصلي لشوارد الفوسفور عند الحيوانات مستأصلة المبيض OVX بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة SHAM، فيما يتعلق بأفراد المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد سواء في حالة الوقاية أو المعالجة فكان هناك انخفاض ملحوظ في المعدل المصلي لشوارد الفوسفور، رغم بقاء فارق معنوي عند مقارنته بالمجموعة الشاهدة حيث كانت القيمة الاحتمالية ($P=0.001<0.05$) عند المجموعة المعالجة و ($P=0.003<0.05$) عند مجموعة الوقاية، في حين كان التغير معنوي بين هذه المجموعات بالمقارنة مع المجموعة مستأصلة المبايض والقيمة الاحتمالية ($P=0.00<0.05$)، الجدول (6)، المخطط (7).

جدول (6) متوسط تركيز الفوسفور المصلي لدى المجموعات الأربعة

المجموعات	عدد الأفراد N	المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average± SD
الشاهدة	10	3.81±0.10
مستأصلة المبيضين	10	2.70±0.08
الموقاة بالأكسيناتيد	10	3.35±0.02
المعالجة بالأكسيناتيد	10	3.23±0.01



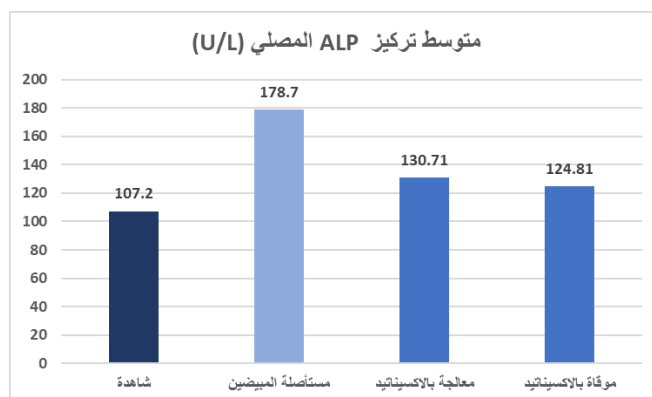
مخطط (7): يبين الفروق في متوسط تركيز شوارد الفوسفور عند المجموعات الأربعة

3-412- قياس الفعالية المصلية لإنزيم الفوسفاتاز القلوي ALP:

لوحظ ارتفاع معنوي (القيمة الاحتمالية $P=0.00<0.05$) في الفعالية المصلية لإنزيم الفوسفاتاز القلوي عند الحيوانات مستأصلة المبيض OVX بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة SHAM، أما عند أفراد المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد، سواء في حالة الوقاية أو العلاج، فقد اتضح وجود انخفاض ملحوظ في المعدل المصلي لأنزيم الفوسفاتاز القاعدي رغم وجود فارق معنوي عند مقارنته بالمجموعة الشاهدة، حيث كانت القيمة الاحتمالية $(P=0.00<0.05)$ في مجموعة المعالجة و $(P=0.00<0.05)$ عند مجموعة الوقاية، في حين كان التغير معنوي بمقارنة هذه المجموعات مع المجموعة مستأصلة المبايض والقيمة الاحتمالية $(P=0.00<0.05)$. الجدول (7)، المخطط (8).

جدول (7) متوسط تركيز ALP المصلي لدى المجموعات الأربعة

المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average ± SD	عدد الأفراد N	المجموعات
107.23±0.99	10	الشاهدة
178.7±1.85	10	مستأصلة المبيضين
124.81±0.84	10	الموقاة بالأكسيناتيد
130.71±0.75	10	المعالجة بالأكسيناتيد



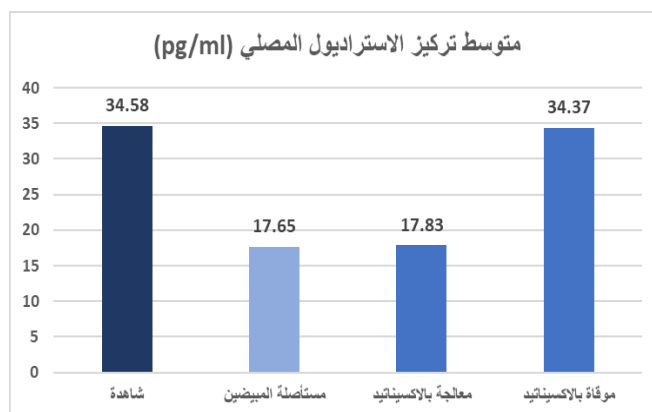
المخطط (8): يبين الفروق في المستوى المصلي لأنزيم ALP عند المجموعات الأربعة

4-1-4- قياس التركيز المصلي لهرمون الاستراديول E2:

لوحظ انخفاض معنوي (القيمة الاحتمالية $P=0.00<0.05$) في المعدل المصلي لهرمون الاستراديول عند الحيوانات مستأصلة المبيض بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة SHAM، أما عند أفراد المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد، سواء في حالة الوقاية أو العلاج، فقد اتضح عدم وجود تغير معنوي في المعدل المصلي لهرمون الاستراديول، الجدول (8)، المخطط (9).

جدول(8) متوسط تركيز الاستراديول المصلي لدى المجموعات الأربعة

المجموعات	عدد الأفراد N	المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري Average± SD
الشاهدة	10	34.58±0.27
مستأصلة المبيضين	10	17.65±0.27
الموقاة بالأكسيناتيد	10	17.83±0.11
المعالجة بالأكسيناتيد	10	34.37±0.22



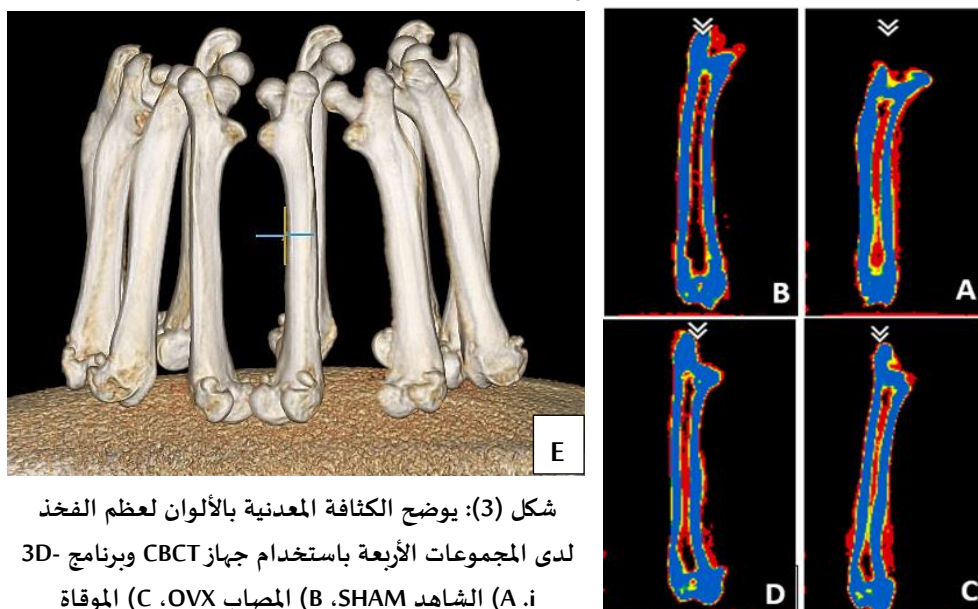
المخطط (9): يبين الفروق في المستوى المصلي لهرمون الاستراديول عند المجموعات الأربعة

4-3- التغيرات في الكثافة العظمية المعدنية:

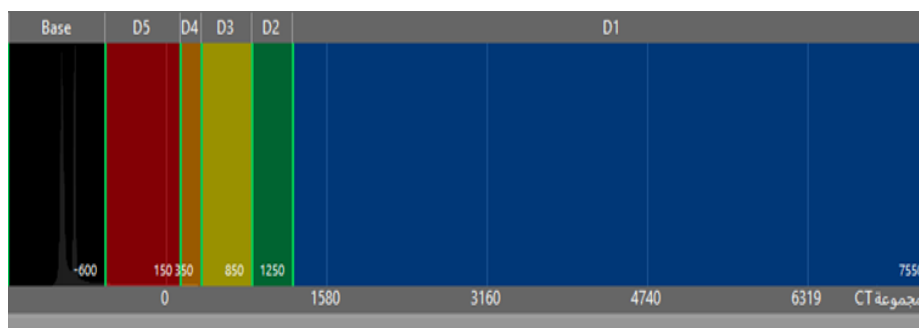
أظهرت نتائج التصوير ثلاثي الأبعاد المقطعي المحوسب ذو الحزمة المخروطية CBCT وباستخدام Ez3D-i software، أن الكثافة المعدنية انخفضت بشكل ملحوظ في عظم الفخذ لدى مجموعة OVX بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة SHAM، بينما زادت بشكل ملحوظ لدى المعاملة بالأكسيناتيد سواء في مجموعة الوقاية أو المعالجة، وذلك عن طريق المشعرات اللونية الخاصة بالبرنامج والمعبرة عن الكثافة العظمية، وتم ذلك عند وضع محور النافذة التفاعلية الخاصة بالبرنامج في المكان المطلوب قياس كثافته العظمية، كما في الشكل (2) ثم مقارنة ألوان الصور الشعاعية الناتجة، الشكل (3) مع مناطق D في الشكل (4). كما تم التعبير عن الكثافة المعدنية في العظم من خلال برنامج Ez3D-plus، حيث تم اختيار منطقة من عظم فخذ وقياس الكثافة المعدنية فيها عند كل مجموعة من المجموعات الأربعة، كما في الشكل (5) والتي تم التعبير عنها من خلال المخطط البياني وقيمة المتوسط لدى المجموعات الأربعة، الشكل (6)، الجدول (9). حيث أظهرت النتائج انخفاض قيمة متوسط الكثافة المعدنية لدى مجموعة OVX، وزيادته لدى مجموعتي الوقاية والعلاج بالمقارنة مع مجموعة OVX.



شكل (2): يُظهر توضع النافذة التفاعلية على طول العظم



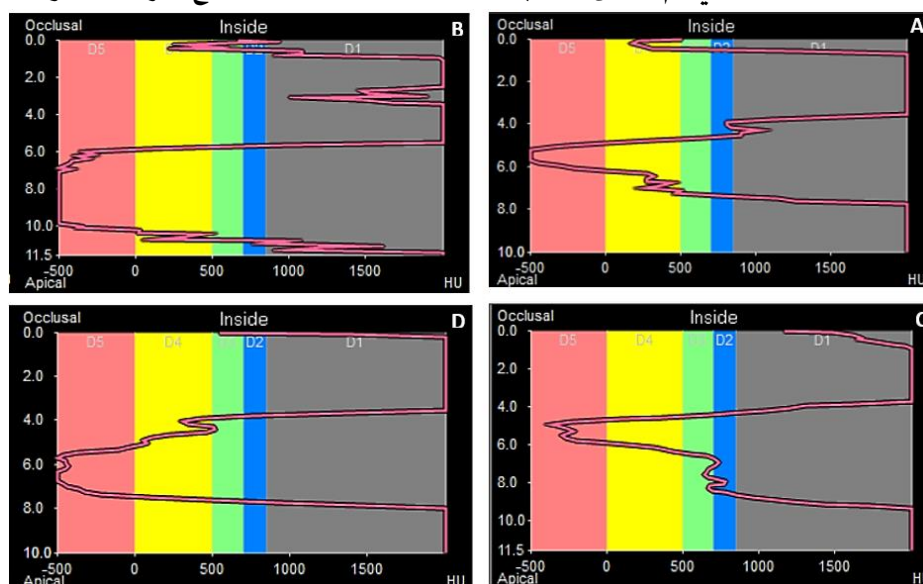
شكل (3): يوضح الكثافة المعدنية بالألوان لعظم الفخذ لدى المجموعات الأربعة باستخدام جهاز CBCT وبرنامج 3D- (A. i) الشاهد (SHAM, B) المصاب (OVX, C) الموقاة بالاكسيناتيد، (D) المعالجة بالاكسيناتيد، (E) صورة CBCT لعظام الفخذ عند الجرذان.



شكل (4): يوضح مناطق الكثافة بالألوان حسب الأفضلية من الكثافة الأعلى D1 وحتى الكثافة الأدنى D5



شكل (5): المنطقة التي تم قياس كثافتها العظمية المعدنية لدى جميع أفراد المجموعات



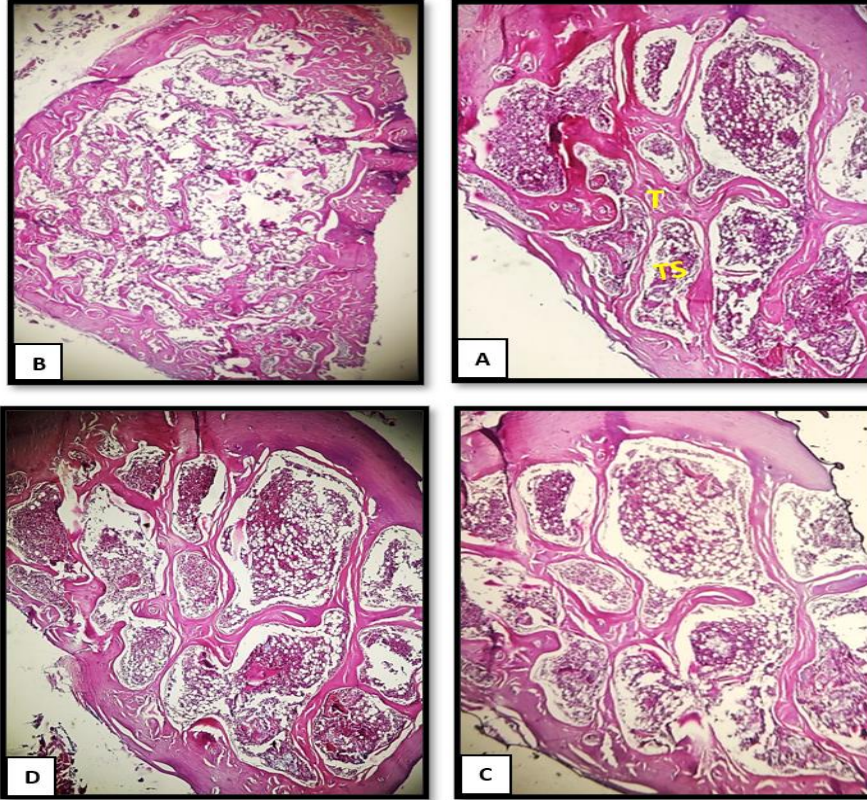
شكل (6): مخطط بياني يوضح الكثافة المعدنية للمنطقة المقاسة لدى المجموعات الأربعة (A) مجموعة الشاهد، (B) مجموعة OVX، (C) المجموعة المعالجة بالأكسجيناتيد، (D) المجموعة الموقاة بالأكسجيناتيد.

جدول (9) يوضح المتوسط الحسابي والانحراف المعياري للكثافة المعدنية لكل من المجموعات الأربعة

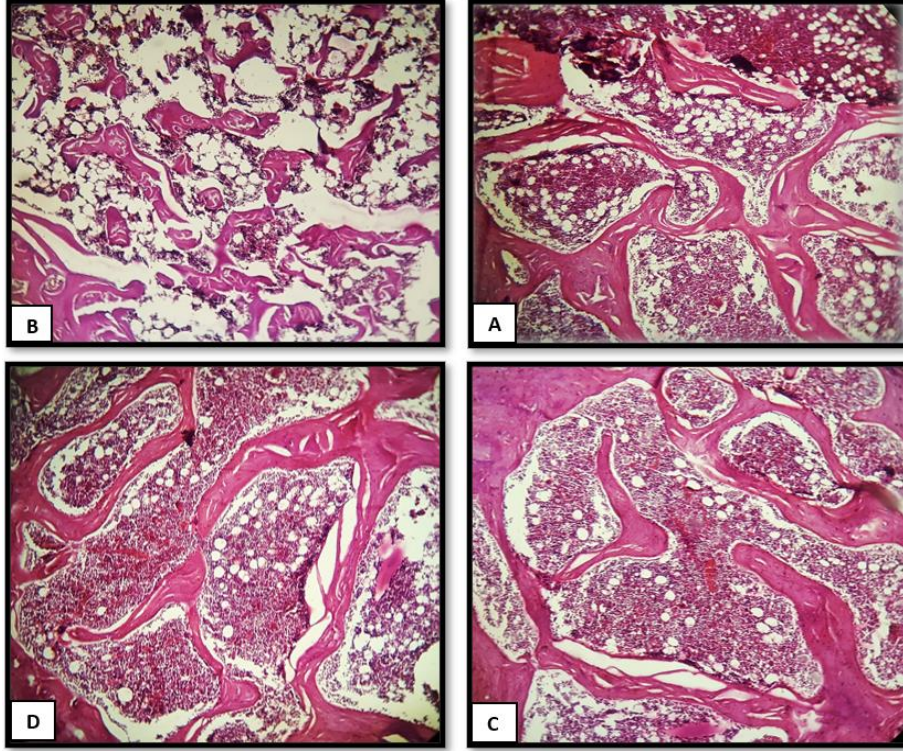
Standard Deviation	Mean Value	المجموعات
2687.6	2855.2	الشاهد SHAM
623.9	1398.6	مستأصلة المبايض OVX
720.2	2167.0	المعالجة بالأكسجيناتيد
2557.2	2642.8	الموقاة بالأكسجيناتيد

2-4- التغيرات النسيجية لعظم الفخذ:

أبدت المقاطع النسيجية في المشاشة العلوية Epiphysis لعظم الفخذ لجرذان المجموعة OVX، الملونة بصبغة هيماتوكسيلين-ايوزين، المظهر النمطي لهشاشة العظام، حيث بدت شبكة الترابيق غير منتظمة، أقل عدداً، وأقل كثافة مقارنة بالمجموعة الشاهدة وبدت الفراغات النقية أكثر اتساعاً وتمتد على مساحة نسبية أكبر مقارنة بجرذان المجموعة الشاهدة، شكل (7،8).

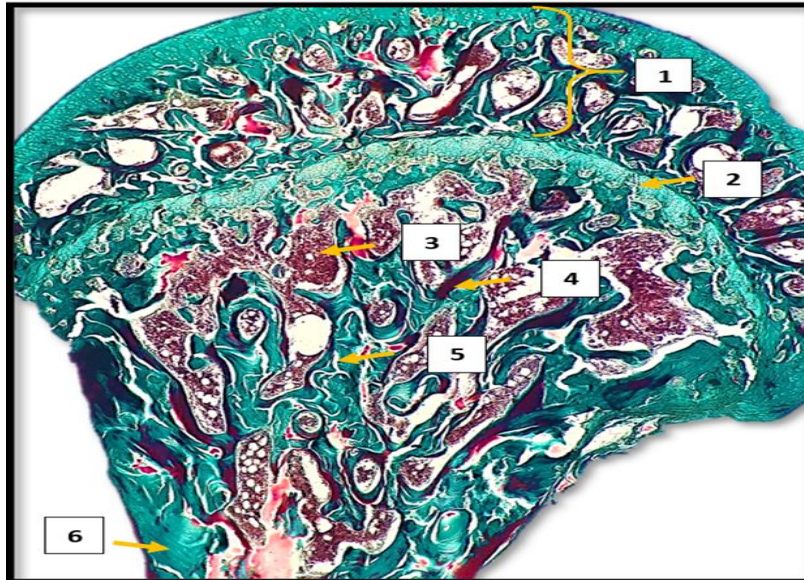


شكل (7): يوضح بنية نسيج مشاشة عظم الفخذ (A): البنية الطبيعية لدى مجموعة الشاهد، (B): التخریب الحاصل في الترابيق والمساحات التريبقية لدى مجموعة OVX، (C، D): يوضح التحسن في الترابيق والمساحات التريبقية لدى مجموعة العلاج ومجموعة الوقاية على التوالي، مقارنة مع مجموعة OVX.
T: التريبق Trabecular Space، المساحة التريبقية Trabecular Space (H&E, x40).

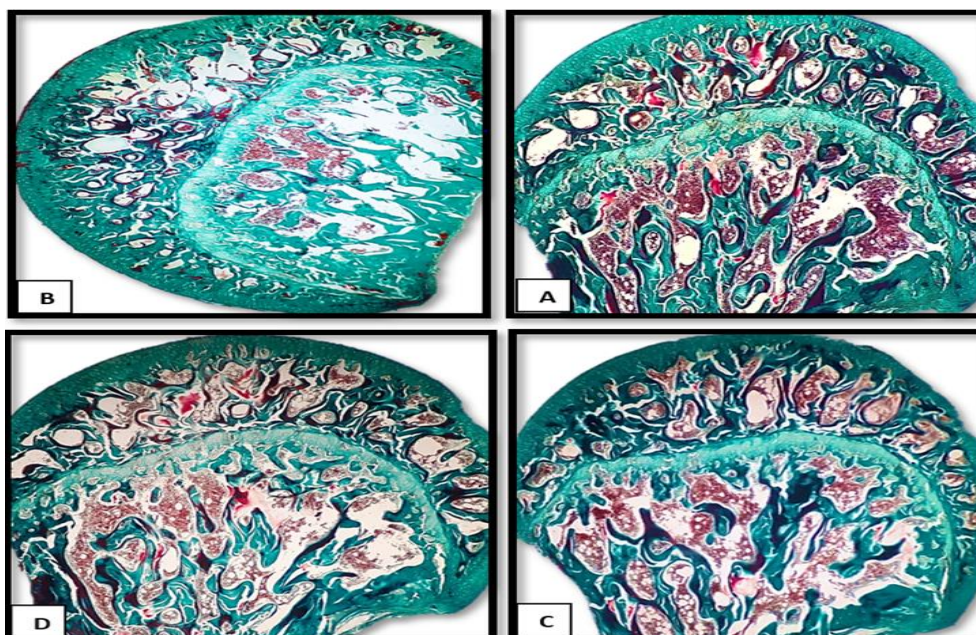


شكل (8): يوضح بنية نسيج مشاشة عظم الفخذ (A): مجموعة الشاهد، (B): مجموعة OVX، (C): مجموعة الوقاية (D): مجموعة العلاج، (H&E, x40).

كما أظهرت المقاطع النسيجية الملونة بصيغة ماسون ثلاثي الألوان البنية العظمية السليمة لدى أفراد المجموعة الشاهدة، الشكل (9) في حين أبدت قلة في النسيج المشبه بالعظم Osteoid لدى الأفراد مستأصلة المبايض بالمقارنة مع الشاهد. وفيما يتعلق بالبنية النسيجية لعظام المجموعات المعاملة بالأكسيناتيد سواء في الوقاية أو العلاج فقد اتضح تحسن ملحوظ في البنية من خلال زيادة عدد الترابيق وتراجع الفراغات النقية وزيادة في النسيج المشبه بالعظم بحيث بدت قريبة من البنية لدى المجموعة الشاهدة، شكل (7،8،10).



شكل (9): يوضح البنية الطبيعية لرأس عظم الفخذ، (1) المشاشة العلوية، (2) غضروف النمو، (3) نقي العظم داخل المساحة التريبقية، (4) النسيج المشبه بالعظم osteoid، (5) عظم تربريقي، (6) عظم قشري



شكل (10): يوضح بنية نسيج رأس عظم الفخذ (A): البنية الطبيعية لدى مجموعة الشاهد، (B): التخریب الحاصل في الترابيق والمساحات التريبقية بالإضافة إلى قلة في النسيج المشبه للعظم Osteoid لدى مجموعة (D.C, OVX): يوضح التحسن في الترابيق والمساحات التريبقية وزيادة النسيج المشبه بالعظم لدى مجموعة العلاج ومجموعة الوقاية على التوالي، مقارنة مع مجموعة OVX. (Masson trichrome, x40).

المناقشة.

العظم هو نسيج نشط استقلابيا يتقلب باستمرار، في حال نقص هرمون الاستروجين، يتم ارتشاف المزيد من العظام بواسطة ناقضات العظم ويؤدي في النهاية إلى خسارة العظام. يمكن أن تنعكس درجة اقتران عمليات تكوين العظم وارتشافه بشكل عام عن طريق توازن الكالسيوم والفوسفور. بينت نتائج الدراسة الحالية انخفاض معنوي في التركيز المصلي لكل من الاستراديول والكالسيوم والفوسفور، مصحوباً بزيادة معنوية في تركيز إنزيم ALP عند الجرذان مستأصلة المبايض مقارنة مع المجموعة الشاهدة، تتفق هذه النتائج مع الدراسة السابقة (Hassan *et al*, 2019) (Chen *et al*, 2019; Maheshwari *et al*, 2015; *al*, 2013)، بينما تخالفت مع دراسات من حيث انخفاض مستوى الكالسيوم والفوسفور (Kim *et al*, 2006; Seif, 2014). يؤدي نقص هرمون الاستراديول المرتبط باستئصال المبايض إلى تحفيز تكوين اللمفاويات البائية بشكل انتقائي، مما يؤدي إلى تراكم الخلايا ما قبل B (pre-B cell) في نقي العظم، مما يحفز الارتشاف العظمي بواسطة الخلايا الكاسرة للعظم. كما يؤدي نقص هرمون الاستراديول إلى زيادة كبيرة في عدد الخلايا الكاسرة للعظم، مما يجعل العظام أكثر عرضة للهشاشة، ويؤدي أيضاً إلى زيادة عمر كاسرات العظم، وانخفاض في عمر بانيات العظم، مع تمعدن غير مكتمل بسبب انخفاض المدة الفاصلة بين دورات إعادة التشكل العظمي (Hassan *et al*, 2013).

علاوة على ذلك، فإن استئصال المبايض يسبب فرط نشاط الدريقات الذي يؤدي إلى تغيرات في تركيز الكالسيوم نتيجة ارتفاع تركيز الPTH مما يؤدي إلى إطلاق الكالسيوم والفوسفور من الهيكل العظمي إلى الدم ومنه إلى البول، ويحدث نقص في إعادة امتصاص الكالسيوم والفوسفور. يؤدي اطرأح الكالسيوم والفوسفور عن طريق البول إلى انخفاض التركيز المصلي للكالسيوم (Bonny *et al*, 2008; Hassan *et al*, 2013).

يمكن أن يساهم نشاط إنزيم ALP المرتفع المرافق لاستئصال المبيض في زيادة معدل الاستقلاب العظمي bone turnover، حيث يتميز بزيادة كل من ارتشاف العظم وإعادة تكوينه، ولكن ارتشاف العظم يزيد على التكوين مما يؤدي إلى خسارة شاملة للعظم (Hassan *et al*, 2013).

أما بالنسبة لتفسير التأثير المخرب لنقص هرمون الاستروجين على البنية النسيجية للعظم عند الأفراد مستأصلة المبايض، فيعود إلى زيادة معدل إعادة النمذجة remodeling وقلة تكوين العظام بالنسبة للارتشاف (Filipodia., & Šošić-Jurjević, 2012).

أظهرت نتائج الدراسة أنّ المعاملة بالأكسيناتيد- ناهض مستقبل GLP-1- بطأت من زيادة وزن الجسم عن طريق تقليل كتلة الدهون ومنعت خسارة الكتلة العظمية كما عززت من الكثافة المعدنية للعظم لدى الجرذان مستأصلة المبايض، اتفقت هذه النتائج مع دراسات سابقة (Zhao *et al*, 2017; Ma *et al*, 2013).

تعتبر الدهون من المحددات الرئيسية لفقدان العظام مع تقدم العمر كما تساهم الرواسب الدهنية في زيادة الوزن التي يسببها استئصال المبايض. أشارت الدراسات السابقة إلى زيادة كتلة الدهون كعامل مهم يساهم في تدهور العظام لدى الأشخاص الذين يعانون من السمنة المفرطة. علاوة على ذلك، تم الإبلاغ أيضاً عن وجود علاقة بين السمنة والكسور، والتي ربما تكون نتيجة لتغير كتلة العظام أو هشاشة العظام. هناك دراسات تشير إلى أن العلاج بالأكسيناتيد قلل بشكل كبير من عدد الخلايا الدهنية لنقي العظم في جرذان OVX. وقد ترتبط تأثيرات الأكسيناتيد المضادة لهشاشة العظام أيضاً بانخفاض فرط شحوم الدم. أظهرت دراسات سابقة أن فرط شحومات الدم عزز تكون الخلايا الكاسرة للعظم وارتشاف العظم، كما أظهرت الآثار المفيدة للأكسيناتيد في تقليل الكوليسترول والدهون الثلاثية في الأشخاص المصابين بمرض السكري (Ma *et al*, 2013).

أظهرت نتائج البحث الحالي أيضاً أن المعاملة بالأكسيناتيد عززت قوة العظام ومنعت تدهور البنية الدقيقة للترابيك كما زادت من النسيج المشبه بالعظم الذي يعد الجزء العضوي غير المعدن في مصفوفة العظم التي تتكون قبل نضوج النسيج العظمي، وأظهرت تحسن كبير في جميع الخصائص الميكانيكية الحيوية للعظام، توافقت النتائج مع دراسات (Zhao *et al*, 2017; Eminov *et al*, 2018; Taleb *et al*, 2020).

بالإضافة إلى تأثير الأكسيناتيد على كثافة العظام وهيكلها وقوتها، أشارت النتائج الحالية إلى الآثار الإيجابية للأكسيناتيد على المؤشرات الكيميائية الحيوية. حيث زادت المعاملة بالأكسيناتيد لمدة 4 أشهر بشكل ملحوظ معدلات الكالسيوم والفوسفور في المصل. تشير هذه النتائج إلى أن الأكسيناتيد قد يمنع هشاشة العظام عن طريق تعديل توازن الكالسيوم والفوسفور. علاوة على ذلك، أظهرت النتائج الحالية أن المعاملة بالأكسيناتيد سواء كوسيلة وقاية أو علاج أدى إلى انخفاض ملحوظ في مستويات ALP في المصل، مما يدل على تأثير تعديل تشكّل العظام للأكسيناتيد، توافقت هذه النتائج مع دراسات (Taleb *et al*, 2020)، بينما تخالفت مع دراسات أخرى (Ma *et al*, 2013).

ويعزى التأثير الإيجابي للأكسيناتيد على صحة العظام، إلى خصائصه الابتنائية التي قد تؤثر على معدل تشكّل العظام bone turnover وبالتالي تحسين الكثافة المعدنية للعظم، حيث يحفز تكوين بانيات العظم ويثبط تكوين ناقضة العظم، فيحد من خسارة الترابيك العظمية؛ خاصة بعد سن اليأس أو استئصال المبيض (Ma *et al*, 2013).

يعد التنسيق بين بانيات العظم وناقضات العظم أمراً بالغ الأهمية في الحفاظ على سلامة الهيكل العظمي. يتوسط RANKL، منشط مستقبل NFkB (RANK)، والواستوبورترين OPG، تعديل تكوين الخلايا الناقضة للعظم osteoclastogenesis بواسطة الخلايا غير الناضجة من سلالة بانيات العظم. OPG هو مستقبل يثبط تنشيط RANKL لتكوين الخلايا الناقضة للعظم، وبالتالي يقلل من ارتشاف العظم. يُعتقد أن نسبة تعبير OPG/RANKL

محدد رئيسي لنشاط تكون ناقضات العظم osteoclastogenic activity. بينت دراسات سابقة أنالأكسيناتيد زاد من تعبير OPG mRNA وقلل من تعبير RANKL mRNA مما يشير إلى أن الأكسيناتيد يثبط تمايز ناقضات العظم عن طريق زيادة نسبة OPG/RANKL (Ma et al, 2013). كما أظهرت العديد من الدراسات أن GLP-1RA يمنع ارتشاف العظم بشكل غير مباشر عن طريق تأثيره على الخلايا C في الغدة الدرقية وتحفيز إنتاج الكالسيوم (Bulchandani et al, 2012).

الاستنتاجات:

تأثير هرمون الغلوكاغون الشبيه بالبيتيد-1 على صحة العظام، وذلك من خلال التأثيرات الإيجابية للأكسيناتيد في العلاج والوقاية من هشاشة العظام الناجمة عن استئصال المبايض، والذي يجعله مرشحاً واعداً كعلاج لهشاشة العظام عند النساء بعد سن اليأس.

قائمة المراجع.

- 1- Bonny, O., Rubin, A., Huang, C. L., Frawley, W. H., Pak, C. Y., & Moe, O. W. (2008). **Mechanism of urinary calcium regulation by urinary magnesium and pH.** *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(8), 1530-1537.
- 2- Bulchandani, D., Nachnani, J. S., Herndon, B., Molteni, A., Pathan, M. H., Quinn, T., ... & Graves, L. (2012). **Effect of exendin (exenatide)—GLP 1 receptor agonist on the thyroid and parathyroid gland in a rat model.** *European journal of pharmacology*, 691(1-3), 292-296.
- 3- Chen, C., Zheng, H., & Qi, S. (2019). **Genistein and silicon synergistically protects against ovariectomy-induced bone loss through upregulating OPG/RANKL ratio.** *Biological trace element research*, 188(2), 441-450.
- 4- Eminov, E., Hortu, I., Akman, L., Erbas, O., Yavasoglu, A., & Cirpan, T. (2018). **Exenatide preserves trabecular bone microarchitecture in experimental ovariectomized rat model.** *Archives of gynecology and obstetrics*, 297(6), 1587-1593.
- 5- Filipović, B., & Šošić-Jurjević, B. (2012). **The Phytoestrogens, Calcitonin and Thyroid Hormones: Effects on Bone Tissue.** *IntechOpen*.
- 6- Harris, H. F. (1900). **On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions.** *Journal of Applied Microscopic Laboratory Methods*, 3(3), 777.
- 7- Hassan, H. A., Wakf, A. M. E., & Gharib, N. E. E. **Role of phytoestrogenic oils in alleviating osteoporosis associated with ovariectomy in rats.** *Cytotechnology*, 65(4), 609-619. (2013).
- 8- Kim, D. J., Park, B. L., Koh, J. M., Kim, G. S., Kim, L. H., Cheong, H. S., ... & Kim, S. Y. (2006). **Methionine synthase reductase polymorphisms are associated with serum osteocalcin levels in postmenopausal women.** *Experimental & molecular medicine*, 38(5), 519-524.

- 9- Ma, X., Meng, J., Jia, M., Bi, L., Zhou, Y., & Wang, Y. (2013). **Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats.** *J Bone Miner Res*, 28(7), 1641-1652.
- 10- Maheshwari, R. A., Dhakwala, F., Balaraman, R., Seth, A. K., Soni, H., & Patel, G. (2015). **Maxcal-C (a polyherbal formulation) prevents ovariectomy-induced osteoporosis in rats.** *Indian journal of pharmacology*, 47(5), 555.
- 11- Melissa, P. S. W., Navaratnam, V., & Yin, C. Y. (2012). **Phytoestrogenic property of Labisia pumila for use as an estrogen replacement therapy agent.** *African Journal of Biotechnology*, 11(50), 11053-11056.
- 12- Seif, A. A. (2014). **Nigella Sativa reverses osteoporosis in ovariectomized rats.** *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1-8.
- 13- Taleb, O. M. A., Wissa, M. Y., Abou El Nour, R. K., Awad, H. A., & Moussa, N. M. (2020). **Potential effectiveness of exenatide in experimentally-induced osteoporosis.** *The Egyptian Rheumatologist*, 42(1), 57-62.
- 14- Yap, M. K. K., & Misuan, N. (2019). **Exendin-4 from Heloderma suspectum venom: From discovery to its latest application as type II diabetes combatant.** *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 124(5), 513-527.
- 15- Zhang, M., Xie, Y., Zhou, Y., Chen, X., Xin, Z., An, J., ... & Chen, Z. (2019). **Exendin-4 enhances proliferation of senescent osteoblasts through activation of the IGF-1/IGF-1R signaling pathway.** *Biochemical and biophysical research communications*, 516(1), 300-306.
- 16- Zhao, C., Liang, J., Yang, Y., Yu, M., & Qu, X. (2017). **The impact of glucagon-like peptide-1 on bone metabolism and its possible mechanisms.** *Frontiers in endocrinology*, 8, 98.