

تأثیر عصاره گیاه پنج انگشت بر فاکتورهای استئوژنیک و آنژیوژنیک و ترمیم شکستگی استخوان‌های بلند

* زهرا حسن‌زاده رستمی، * دکتر محمد حسن افتخاری، ** دکتر محمد جعفر امامی، *** دکتر عبدالرضا رجایی فرد

«دانشگاه علوم پزشکی شیراز»

خلاصه

پیش‌زمینه: یافته‌های موجود بیانگر نقش فیتواستروژن‌ها در حفظ استحکام استخوان و بهبود ترمیم شکستگی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصاره گیاه پنج انگشت به‌عنوان منبع فیتواستروژن‌ها بر فاکتورهای استئوژنیک، آنژیوژنیک و ترمیم شکستگی در زنان سنین قبل از یائسگی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی دوسوکور، ۳۲ زن ۴۵-۲۰ ساله با شکستگی استخوان‌های بلند به دو گروه مورد و شاهد تقسیم شدند. بیماران در گروه مورد روزانه ۱ قرص آگنول حاوی ۴ میلی‌گرم عصاره خشک میوه گیاه پنج‌انگشت به مدت ۸ هفته و بیماران گروه شاهد دارونما دریافت کردند. در ابتدا و انتهای مطالعه، سطوح سرمی آلكالین فسفاتاز و فاکتور رشد اندوتلیوم عروق (VEGF=vascular endothelial growth factor) اندازه‌گیری شد و تشکیل کال استخوانی به کمک عکس‌های پرتونگاری بررسی گردید.

یافته‌ها: در هر دو گروه مطالعه سطح آلكالین فسفاتاز و فاکتور رشد اندوتلیوم عروق سرم نسبت به حالت پایه افزایش یافته بود اما شدت افزایش آلكالین فسفاتاز و تنها در گروه مورد قابل توجه بود (به ترتیب $p=0/05$ و $p=0/01$). در انتهای مطالعه، مشاهده گردید که در ۷۱/۴٪ از افراد گروه مورد و ۵۳/۸٪ از گروه شاهد کال استخوانی تشکیل شده است.

نتیجه‌گیری: دریافت عصاره گیاه پنج انگشت به مدت ۲ ماه در افزایش فاکتور آنژیوژنیک در گروه تحت درمان مؤثر بود. اما اثبات تأثیر عصاره این گیاه در افزایش آلكالین فسفاتاز و تشکیل کال استخوانی نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: گیاه پنج انگشت، فیتواستروژن، شکستگی استخوان، فاکتور رشد اندوتلیوم عروق

دریافت مقاله: ۶ ماه قبل از چاپ؛ مراحل اصلاح و بازنگری: ۲ بار؛ پذیرش مقاله: ۱ ماه قبل از چاپ

The Impact of "Vitex Agnus Castus" Extract on Osteogenic and Angiogenic Factors and Fracture Healing in Women with Long Bone Fracture

*Zahra Hassanzadeh Rostami, MSc; *Mohammad Hassan Eftekhari, Ph.D;

Mohammad Jafar Emami, MD; *Abdolreza Rajaeefard, Ph.D

Abstract

Background: Phytoestrogens enhance bone integrity through prevention of bone loss and stimulation of bone formation, and also facilitation of bone healing. The aim of the present study was to evaluate the effect of *vitex agnus castus* extract, as a source of phytoestrogen on alkaline phosphatase and VEGF (vascular endothelial growth factor) and also callus formation in women with long bone fractures.

Methods: In a double-blind randomized placebo controlled trial, 32 women with long bone fracture, age 20-45 years old, were randomly divided into the VAC (*vitex agnus castus*), receiving 1 Agnugol tablet (containing 4 mg dried fruit extract of *vitex agnus castus*)-daily for 8 weeks or a placebo group. Serum alkaline phosphatase and VEGF were measured at the beginning and the end point, and also callus formation was checked at the end of study.

Results: Serum alkaline phosphatase was increased in both groups compared to the baseline. Although the elevation of ALP (Alkaline phosphatase) in placebo group was not significant, in treatment group, ALP was considerably increased ($p=0.05$). Comparison of the change of VEGF showed that, only in VAC group, VEGF level was significantly increased ($p=0.01$). The callus formation which revealed the fracture healing, in VAC and control groups was 71.4% and 53.8%, respectively.

Conclusions: Treatment with vitex agnus castus extract for 2 months could enhance the VEGF level, however, further studies are need to show the effects of vitex agnus castus extract on alkaline phosphatase level and callus formation.

Keywords: Phytoestrogens; Vitex agnus castus, Fractures, bone; Vascular endothelial growth factor

Received: 6 months before printing ; Accepted: 1 month before printing

*Nutritionist, Department of Nutrition, School of Health and Nutrition, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.

** Orthopaedic Surgeon, Orthopaedic Department, Research Center for Bone & Joint Diseases, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.

***Epidemiologist, Department of Epidemiology, School of Health & Nutrition, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.

Corresponding author: Mohammad Hassan Eftekhari, Ph.D

Department of Nutrition, School of Health and Nutrition, Razi Street, Shiraz, Iran

E-mail: h_eftkhari@yahoo.com

مقدمه

سالانه میلیون‌ها شکستگی رخ می‌دهد و ۲٪ جمعیت جهان را درگیر می‌کند^(۱,۲). حجم زیادی از شکستگی‌ها حاصل ضربه‌های سنگین مشابه تصادفات جاده‌ای می‌باشد^(۳). در عین حال بعضی از بیماری‌ها نظیر پوکی استخوان که با افزایش سن رخ می‌دهد، می‌توانند در بروز شکستگی‌های غیرضربه‌ای دخالت داشته باشند^(۲,۴).

مدت‌زمان کوتاهی بعد از ایجاد شکستگی در استخوان، فرآیند ترمیم آغاز می‌شود و ساختار اصلی استخوان اولیه بدست می‌آید^(۱). اما ممکن است فرآیند ترمیم شکستگی به‌طور کامل انجام نگیرد^(۵). بنابراین نیاز به مداخلات درمانی در درمان شکستگی استخوان می‌باشد. در حین فرآیند ساخت استخوان، تعدادی از مارکرهای استخوانی به جریان خون آزاد می‌شوند^(۶). آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین از دقیق‌ترین مارکرهای سرمی ساخت استخوان می‌باشند. آلکالین فسفاتاز نشان دهنده فعالیت آنزیمی استئوبلاست‌ها است و استئوکلسین نیز از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی است که در رشد و تمایز استئوبلاست‌ها و مینرالیزاسیون استخوان نقش مهمی ایفا می‌کنند^(۷,۸).

علاوه بر درمان‌های دارویی، استفاده از مکمل‌های غذایی و درمان‌های جایگزین در درمان شکستگی کمک کننده می‌باشند^(۴,۹). در سال‌های اخیر مطالعات وسیعی در زمینه تأثیر فیتواستروژن‌ها بر حفظ سلامت استخوان انجام گرفته است. فیتواستروژن‌ها ترکیبات مشتق از گیاهان می‌باشند که در ۳ گروه فلاونوئیدها، کومستان‌ها و لیگنان‌ها طبقه‌بندی می‌شوند^(۱۰). این ترکیبات ساختار و عملکرد شبیه به استرادیول دارند اما اثر آنها نسبت به استروژن ضعیف‌تر است^(۱۰).

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که بین دریافت فیتواستروژن‌ها و چگالی مواد معدنی استخوان ارتباط مثبتی وجود دارد^(۱۱). فیتواستروژن‌ها از طریق القای تکثیر استئوبلاست‌ها و مهار فعالیت‌های ماکروفاژی و استئوکلاستی می‌توانند فعالیت متابولیکی را به سمت تولید استخوان تغییر داده و تجزیه بافت استخوانی را کاهش دهند^(۹). از طرفی فیتواستروژن‌ها از طریق اثر وازودیلاتوری با واسطه نیتریک اکسید در اطراف

ناحیه شکستگی و همچنین از طریق افزایش فاکتور رشد اندوتلیوم عروق (VEGF)^۱ و افزایش رگ‌زایی در آن ناحیه می‌توانند جریان خون را به ناحیه آسیب‌دیده افزایش دهند و در بهبود شکستگی مؤثر باشند^(۹,۱۲). فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی به‌عنوان یک واسطه قوی برای آنژیوژنز شناخته شده است که توسط سلول‌های التهابی تولید شده و بعد از شکستگی به ناحیه آسیب دیده فراخوانده می‌شود و باعث تشکیل عروق خونی جدید و خون‌رسانی به ناحیه آسیب دیده می‌گردد^(۱۳,۱۴).

گیاه پنج انگشت به‌عنوان یکی از منابع غنی از فیتواستروژن‌ها شناخته شده است^(۱۵). این گیاه بومی نواحی مرکزی آسیا و اروپای مدیترانه‌ای است و در مناطق مختلفی از ایران با نام بومی فلفل کوهی نیز یافت می‌شود. نام علمی این گیاه *Vitex agnus castus* و متعلق به تیره شاهپسند^۲ است^(۱۶,۱۷). گیاه پنج انگشت از زمان‌های قدیم در طب سنتی ایران مورد استفاده بوده است. در سال‌های اخیر نیز تحقیقاتی پیرامون نقش گیاه پنج انگشت در کاهش تجزیه استخوان، حفظ توده استخوان و تسریع ترمیم شکستگی انجام گرفته است^(۹,۱۵). اما این مطالعات محدود به مدل‌های حیوانی بوده و تاکنون هیچ کارآزمایی بالینی در این زمینه انجام نشده است. بنابراین با توجه به وجود فیتواستروژن‌های مختلف در گیاه پنج انگشت و گزارش‌هایی پیرامون نقش بالقوه این گیاه در درمان شکستگی، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره گیاه پنج انگشت بر تولید فاکتورهای سرمی آلکالین فسفاتاز و آنژیوژنیک و تشکیل کال استخوانی در حین درمان شکستگی استخوان‌های بلند در زنان سنین قبل از یائسگی بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به روش کارآزمایی بالینی تصادفی دوسوکور انجام گرفت. افراد مورد مطالعه، ۳۲ زن ۲۰-۴۵ ساله با شکستگی تروماتیک استخوان‌های بلند بودند. این افراد از بین مراجعه کنندگان به بیمارستان‌های شهید دکتر چمران و شهید رجایی شیراز از اردیبهشت تا دی ۱۳۹۱ انتخاب شدند. معیارهای

1. Vascular endothelial growth factor

2. Verbenacea

جهت تعیین سطح فعالیت بدنی، افراد در ۳ گروه فعالیت سبک (زنان خانه‌دار و افرادی که به شغل‌های رانندگی و کارهای اداری با حداقل فعالیت مشغول هستند)، فعالیت متوسط (قدم زدن روزانه یا پیاده روی ۵/۵ کیلومتر در ساعت، کشاورزی و باغبانی به صورت نیمه‌وقت و ورزش‌های سبک) و فعالیت شدید (کشاورزی، انجام ورزش‌های سنگین از جمله بسکتبال و فوتبال) تقسیم‌بندی شدند.

به منظور اندازه‌گیری سطوح سرمی فاکتورهای مورد نظر قبل و بعد از مداخله از هر بیمار ۵ سی سی نمونه خون ناشتا گرفته شد و پس از جداسازی سرم در فریزر 20°C - نگهداری شد و در نهایت سطح سرمی آلکالین فسفاتاز به روش کالری متری و VEGF به روش $^3\text{ELISA}$ تعیین گردید. عکس‌های پرتونگاری نیز در ابتدا و انتهای مطالعه به منظور تعیین تشکیل کال استخوانی به عنوان معیار ترمیم شکستگی (تشکیل یا عدم تشکیل کال در ناحیه شکستگی) توسط پزشک متخصص ارتوپد (نویسنده سوم) بررسی شدند.

تحلیل داده‌ها با نرم افزار آماری SPSS انجام شد. با توجه به نرمال نبودن توزیع متغیرها، در این مطالعه از آزمون‌های غیرپارامتری «ویلکاکسون»^۴ به منظور مقایسه متغیرها قبل و بعد از مداخله در هر گروه؛ «من‌ویتنی»^۵ برای مقایسه متغیرها در دو گروه مورد و شاهد؛ و برای بررسی متغیرهای کیفی از آزمون‌های غیرپارامتری «مجدور خی»^۶ و فیشر استفاده گردید. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مطالعه بر روی ۲۹ زن در دو گروه مورد و شاهد نشان داد بین میانگین سن بیماران در دو گروه مورد ($34/86 \pm 8/33$ سال) و شاهد ($38/35 \pm 9/27$ سال) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بالاترین نرخ شکستگی در استخوان تیبیا ($0/58/6$) و کمترین شکستگی متعلق به استخوان هومروس ($0/17/2$) بود. تعداد افراد با شکستگی‌های تیبیا، فمور و هومروس در گروه

ورود به مطالعه عبارت بودند از: زنان سنین قبل از یائسگی، تشخیص قطعی شکستگی در قسمت بدنه یکی از استخوان‌های فمور، تیبیا یا هومروس. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: بارداری و شیردهی، سنین بعد از یائسگی، مصرف داروهای مربوط به بیماری‌های مزمن از قبیل سرطان، دیابت، بیماری‌های کلیوی، کبدی، قلبی، داروهای مؤثر بر متابولیسم استخوان، ترکیبات گیاهی حاوی فیتواستروژن‌ها، مولتی ویتامین، مواد معدنی و داروهای هورمونی، مصرف الکل و استعمال دخانیات.

این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز با شماره ۶۲۳۵-۹۱ قرار گرفت. پس از جلب رضایت بیمار و تکمیل برگه رضایت‌نامه، پرسشنامه مشخصات بیمار (شامل سن، علت شکستگی، نوع استخوانی که دچار شکستگی شده است و سابقه شکستگی) و پرسشنامه بسامد خوراک^۱ و ویژه دریافت فیتواستروژن‌ها در دو گروه مطالعه توسط پرسشگر تکمیل گردید. در این مطالعه از پرسشنامه بسامد خوراک اعتبارسنجی شده گروه تغذیه دانشکده بهداشت و تغذیه دانشگاه علوم پزشکی شیراز استفاده شد.

از نظر مقدار مصرف فیتواستروژن‌ها، افراد مورد مطالعه در سه گروه دریافت کم، متوسط و زیاد قرار گرفتند. تمامی بیماران شرکت کننده در این مطالعه تحت جراحی جاناندازی باز با تثبیت داخلی قرار گرفتند.

از بین ۳۲ بیمار، ۳ نفر از مطالعه خارج شدند و در نهایت ۲۹ نفر در مطالعه باقی ماندند. بیماران طبق روش تصادفی بلوک متوازن^۲ به دو گروه مورد (۱۵ نفر) و شاهد (۱۴ نفر) تقسیم شدند. بیماران در گروه مورد به مدت ۸ هفته روزانه ۱ قرص آگنوگل حاوی $3/2-4/8$ میلی‌گرم عصاره خشک میوه گیاه پنج انگشت (تهیه شده از شرکت گل دارو، ایران)؛ و بیماران گروه شاهد در طول مدت مطالعه قرص‌های دارونمای مشابه (تهیه شده در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز) دریافت کردند. مصرف دارو در طول دوره درمان هر ۲ هفته یکبار توسط تماس تلفنی پیگیری می‌شد.

3. Enzyme linked immunoSorbent assay

4. Willcoxon Signed Ranked

5. U- Mann Whitney

6. Chi-square

1. Food frequency questionnaire

2. Balanced Block Randomization

پس از ارزیابی تشکیل کال استخوانی در انتهای مطالعه، مشاهده گردید که در ۷۱/۴٪ از بیماران گروه مورد و ۵۳/۸٪ از گروه شاهد کال استخوانی تشکیل شد اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/44$).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره گیاه پنج انگشت باعث افزایش سطوح سرمی آلکالین فسفاتاز و فاکتور آنژیوژنیک (VEGF) می‌شود و همچنین در افزایش تشکیل کال استخوانی نقش مؤثری دارد. اما فقط افزایش مشاهده شده در شاخص VEGF از نظر آماری معنی دار بود.

یافته‌های موجود حاکی از آن است که در حین انجام فرایند ساخت یا بازسازی استخوان، تعدادی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در خون آزاد می‌شوند که بازتابی از فعالیت سلول‌های سازنده استخوان یا استئوبلاست‌ها و همچنین وضعیت تثبیت و تحکیم کال‌های ایجاد شده در حین ترمیم استخوان می‌باشند^(۸،۱۸). آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یکی از دقیق‌ترین مارکرهای سرمی ساخت استخوان، باعث هیدرولیز فسفوموناسترها و آزاد شدن فسفات معدنی می‌شود و در مینرالیزاسیون استخوان نقش دارد^(۱۹).

نتایج این مطالعه نشان داد اگرچه آلکالین فسفاتاز در گروه مورد افزایش یافت و شدت این افزایش بیشتر از گروه شاهد بود، اما تفاوت معنی داری بین دو گروه دیده نشد. در سال ۲۰۰۸ «ازترک»^۱ و همکاران^(۹) تأثیر عصاره گیاه پنج انگشت را بر ترمیم شکستگی استخوان تیبیای خرگوش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. به مدت ۳ هفته روزانه ۰/۷۵ میلی‌گرم عصاره میوه گیاه را به‌صورت داخل عضلانی به حیوانات تزریق کردند؛ اما در پایان مطالعه تغییر معنی داری در سطوح آلکالین فسفاتاز سرمی مشاهده نشد. نتایج مطالعات دیگری که در این راستا انجام گرفته است و تغییرات سرمی آلکالین فسفاتاز را تحت تأثیر فلاونوئیدها مورد بررسی قرار داده‌اند متفاوت می‌باشد. در

مورد به ترتیب ۲، ۳ نفر و در گروه شاهد به ترتیب ۵، ۸ و ۲ نفر بود. علت شکستگی در ۶۲/۱٪ تصادف و ۳۷/۹٪ عدم تعادل و افتادن بود. از نظر نوع استخوان آسیب دیده، علت شکستگی، سابقه شکستگی و مقادیر مصرفی فیتواستروژن‌ها بین دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده نشد. از نظر میزان فعالیت بدنی نیز بین دو گروه مطالعه اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۱).

جدول ۱. توزیع فراوانی و درصد بیماران در دو گروه مورد مطالعه برحسب سطح فعالیت بدنی

سطح فعالیت بدنی	گروه مورد	گروه شاهد	کل
سبک	۱۴ (۶۰/۹٪)	۹ (۳۹/۱٪)	۲۳ (۱۰۰٪)
متوسط و شدید	۱ (۱۶/۷٪)	۵ (۸۳/۳٪)	۶ (۱۰۰٪)

Fisher's Exact Test (p -value=۰/۰۸)

میانگین متغیرهای آزمایشگاهی در هر گروه در ابتدا و انتهای مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است. از نظر میزان شاخص آلکالین فسفاتاز بین دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده نشد. اما مقایسه میانگین غلظت آلکالین فسفاتاز در قبل و بعد از مداخله در گروه مورد افزایش قابل توجهی را نشان داد ($p=0/05$). از نظر میزان فاکتور VEGF در ابتدای مطالعه بین دو گروه مورد و شاهد اختلاف معنی دار آماری وجود داشت ($p=0/04$). با مقایسه میانگین این متغیر در انتهای مطالعه نسبت به حالت پایه، در گروه مورد بطور معنی داری افزایش یافت ($p=0/01$) در حالی که در گروه شاهد افزایش VEGF معنی دار نبود.

جدول ۲. مقایسه میانگین شاخص‌های بیوشیمیایی در دو گروه مورد و شاهد قبل و بعد از مداخله

شاخص‌های بیوشیمیایی	گروه مورد	گروه شاهد	p -value [‡] (بین گروه‌ها)
آلکالین فسفاتاز (IU.L ⁻¹)			
قبل از مداخله	۱۸۸/۳۳±۱۶/۲۷	۲۳۳/۴۲±۲۱/۹۸	۰/۰۹
بعد از مداخله	۲۴۰/۴۰±۲۱/۴۹	۲۶۷/۳۵±۲۲/۵۰	۰/۴۲
p -value (در هر گروه)			
VEGF (ng.ml ⁻¹)			
قبل از مداخله	۲۶۹/۰۴±۱۱۶/۶۳	۵۶۶/۴۴±۱۵۲/۹۸	۰/۰۴
بعد از مداخله	۶۴۰/۰۳±۲۴۰/۱۶	۸۴۶/۳۶±۴۱۲/۵۸	۰/۸۴
p -value (در هر گروه)			

‡‡ آزمون ویلکاکسون، ‡ آزمون من وینتی

شکل داده و به بافت استخوانی دارای عروق خونی تبدیل می‌شود.

یافته‌های بالینی مطالعه حاضر در خصوص تشکیل کال استخوانی نشان داد که در مقایسه با گروه شاهد که میزان تشکیل کال استخوانی ۵۳/۸٪ بود، در گروه مورد عصاره گیاه پنج انگشت توانست به میزان ۷۱/۴٪ در تشکیل کال نقش داشته باشد. با این حال این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما نتایج مطالعه حیوانی «ازترک» و همکاران^(۹) نشان داد که عصاره گیاه پنج انگشت به‌طور معنی‌داری تشکیل کال استخوانی را افزایش می‌دهد. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر اختلاف مشاهده شده در تشکیل کال بین دو گروه قابل‌توجه بود، اما اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد که احتمال دارد به علت کم‌بودن حجم نمونه باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت عصاره گیاه پنج انگشت باعث افزایش آلکالین فسفاتاز سرمی می‌شود و در افزایش فاکتور آنژیوژنیک نقش مؤثری دارد. یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر تأثیر احتمالی عصاره این گیاه را در بهبود درمان شکستگی استخوان نشان داده است اما نیاز به مطالعات بیشتری با حجم نمونه بالاتر برای اثبات کامل اثر درمانی فیتواستروژن‌های گیاه پنج انگشت می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی خانم زهرا حسن زاده رستمی می‌باشد و به شماره طرح ۶۲۳۵-۹۱ توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز حمایت مالی گردیده است که بدین وسیله تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از اعضای محترم مرکز تحقیقات جراحی استخوان و مفاصل دانشگاه علوم پزشکی شیراز برای راهنمایی و همکاری در اجرای طرح، و مسئولین بیمارستان‌های شهید دکتر چمران و شهید رجایی شیراز و بیماران شرکت کننده در این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

سال ۲۰۰۹ «هو»^۱ و همکاران^(۱۲) یک مدل شکستگی فمور در موش صحرایی ایجاد کردند و به مدت ۲۱ روز، تأثیر دو دوز ۲۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ و ۲۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ از فیتواستروژن فورمونوتین را مورد آزمایش قرار دادند و گزارش کردند که در روز ۱۴ بعد از شکستگی، بیان ژن آلکالین فسفاتاز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین نتایج یک مطالعه در محیط *in vitro*^(۲۰) در مورد نقش فلاوونول‌های کوئرستین و کامپفرول نشان داد که این دو فلاوونول می‌توانند فعالیت سلول‌های استئوبلاست MG-63 را تحریک کنند و فعالیت آلکالین فسفاتاز را با یک روش وابسته به دوز و وابسته به زمان افزایش دهند.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و بررسی مطالعاتی که در این زمینه انجام گرفته است، می‌توان نتیجه گرفت که دریافت فیتواستروژن‌ها می‌تواند فعالیت آلکالین فسفاتاز را افزایش دهد. اما افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز وابسته به دوز فیتواستروژن دریافتی است.

در ارتباط با فاکتور آنژیوژنیک، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پس از ۶۰ روز درمان با عصاره گیاه پنج انگشت، سطح سرمی VEGF در گروه مورد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این یافته‌ها موافق با مطالعه «هو» و همکاران است^(۱۲). آنان گزارش کردند که فیتواستروژن‌های فورمونوتین موجود در گیاه *Astragalus membranaceus* بر روی شاخص‌های سرمی ساخت استخوان و همچنین VEGF و گیرنده آن (VEGF-R2) اثر مثبت دارند. طبق این گزارش، در روز سوم که مرحله اول تکوین غضروف می‌باشد، در مقایسه با گروه کنترل فورمونوتین توانسته است تعداد رگ‌ها، بیان VEGF و VEGF-R2 را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که فیتواستروژن‌ها بواسطه اثرات تحریکی خود در تولید VEGF می‌توانند فرایند آنژیوژن را افزایش دهند. آنژیوژن نقش اساسی در مرحله استخوان‌سازی داخل غضروفی^۲ از ترمیم استخوان دارد. در این مرحله بافت غضروفی بدون عروق خونی تغییر

1. Huh

2. Endochondral ossification

References

1. Malizos KN, Hantes ME, Protopappas V, Papachristos A. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview. *Injury*. 2006;37 Suppl 1:S56-62.
2. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1585-90. doi: 10.1073/pnas.1018501108.
3. Giannoudis PV, Mushtaq S, Harwood P, Kambhampati S, Dimoutsos M, Stavrou Z, Pape HC. Accelerated bone healing and excessive callus formation in patients with femoral fracture and head injury. *Injury*. 2006;37 Suppl 3:S18-24.
4. Shuid AN, Mohamad S, Mohamed N, Fadzilah FM, Mokhtar SA, Abdullah S, Othman F, Suhaimi F, Muhammad N, Soelaiman IN. Effects of calcium supplements on fracture healing in a rat osteoporotic model. *J Orthop Res*. 2010;28(12):1651-6. doi: 10.1002/jor.21180.
5. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008;39 Suppl 2:S45-57. doi: 10.1016/S0020-1383(08)70015-9.
6. Taniguchi T, Matsumoto T, Shindo H. Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing. *Injury*. 2003;34(7):477-9.
7. Nakagawa H, Kamimura M, Takahara K, Hashidate H, Kawaguchi A, Uchiyama S, Miyasaka T. Changes in total alkaline phosphatase level after hip fracture: comparison between femoral neck and trochanter fractures. *J Orthop Sci*. 2006;11(2):135-9.
8. Seebeck P, Bail HJ, Exner C, Schell H, Michel R, Amthauer H, Bragulla H, Duda GN. Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing? *Bone*. 2005;37(5):669-77.
9. Oztürk A, Ilman AA, Sağlam H, Yalçinkaya U, Aykut S, Akgöz S, Ozkan Y, Yanik K, Kivçak B, Yalçın N, Ozdemir RM. The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2008;14(1):21-7.
10. Park JA, Ha SK, Kang TH, Oh MS, Cho MH, Lee SY, Park JH, Kim SY. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Life Sci*. 2008;82(25-26):1217-23. doi: 10.1016/j.lfs.2008.03.021.
11. Levis S, Strickman-Stein N, Doerge DR, Krischer J. Design and baseline characteristics of the soy phytoestrogens as replacement estrogen (SPARE) study--a clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. *Contemp Clin Trials*. 2010;31(4):293-302. doi: 10.1016/j.cct.2010.03.007.
12. Huh JE, Kwon NH, Baek YH, Lee JD, Choi DY, Jingushi S, Kim KI, Park DS. Formononetin promotes early fracture healing through stimulating angiogenesis by up-regulating VEGFR-2/Flk-1 in a rat fracture model. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(12):1357-65. doi:10.1016/j.intimp.2009.08.003.
13. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*. 2011;42(6):556-61. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035.12.
14. Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vécsei V, Aharinejad S. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J Orthop Res*. 2009;27(10):1293-7. doi: 10.1002/jor.20906.
15. Schmisch S, Boeckhoff J, Wille J, Seidlova-Wuttke D, Rack T, Tezval M, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK. Vitex agnus castus as prophylaxis for osteopenia after orchidectomy in rats compared with estradiol and testosterone supplementation. *Phytother Res*. 2009;23(6):851-8. doi: 10.1002/ptr.2711.
16. Dugoua JJ, Seely D, Perri D, Koren G, Mills E. Safety and efficacy of chastetree (*Vitex agnus-castus*) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol*. 2008;15(1):e74-9. Review.
17. Dogan Y, Ay G, Kozuharova E. A study on the anatomical characteristics of *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae). *Phytol Balcan*. 2008;14(1):97-101.
18. Yu-Yahiro JA, Michael RH, Dubin NH, Fox KM, Sachs M, Hawkes WG, Hebel JR, Zimmerman SI, Shapiro J, Magaziner J. Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture. *J Am Geriatr Soc*. 2001;49(7):877-83.
19. Unsworth J, Kaneez S, Harris S, Ridgway J, Fenwick S, Chenery D, Harrison A. Pulsed low intensity ultrasound enhances mineralisation in preosteoblast cells. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(9):1468-74.
20. Prouillet C, Mazière JC, Mazière C, Wattel A, Brazier M, Kamel S. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(7):1307-13.