

اثر شیر سویا بر تغییرات هیستومورفومتریک مخچه ناشی از برداشت تخمدان در موش‌های صحرایی نوزاد

مینا تجلی^{۱*}، مهناز طاهریان‌فرد^۲ و محمدابراهیم آستانه^۳

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۵

چکیده

سویا محتوی مقدار زیادی ایزوفلاون می‌باشد که از خانواده فیتواستروژن‌هاست. فیتواستروژن‌ها مولکول‌های مشتق شده از گیاه بوده و دارای فعالیت شبه استروژنی هستند. آن‌ها دارای شباهت‌های ساختاری با استروژن پستانداران می‌باشند. این تحقیق با هدف مطالعه اثر شیر سویا بر تغییرات هیستومورفومتریک مخچه ناشی از برداشت تخمدان در موش‌های صحرایی نوزاد صورت گرفته است. برای انجام این تحقیق تعداد ۳۰ قطعه موش صحرایی ماده‌ی یک روزه در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند. در سن یک هفتگی به طور تصادفی تعداد ۲۰ قطعه موش تحت عمل جراحی برداشت تخمدان (OVX) قرار گرفتند و ۵ قطعه موش نیز به عنوان گروه شاهد (sham) جراحی شدند. ۵ موش باقی‌مانده به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سپس درمان سه گروه از موش‌های OVX در ۱۴ روزگی توسط شیر سویا به میزان ۰/۷۵ ml/kg، ۱/۵ ml/kg و ۳ ml/kg دو بار در روز انجام گرفت. در پایان دو ماهگی، پس از خون‌گیری و مرگ بدون درد، مخچه‌ی تمامی موش‌ها جدا و در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. پس از پروسه‌ی بافتی و رنگ‌آمیزی متداول هماتوکسیلین - ائوزین، در زیر میکروسکوپ نوری هیستومورفومتریک مخچه شامل اندازه‌گیری ضخامت لایه‌های گرانولار، مولکولار و اندازه‌ی سلول‌های پورکینژ در ماده‌ی خاکستری مخچه، شمارش سلول‌ها در این لایه‌ها، ضخامت ماده‌ی سفید و مقایسه‌ی نسبت ماده‌ی خاکستری به ماده‌ی سفید مخچه انجام گرفت. با استناد به تحقیق حاضر می‌توان گفت که کم شدن استروژن ناشی از برداشت تخمدان در موش‌های صحرایی نوزاد موجب کاهش ضخامت و تعداد سلول‌ها در بیشتر لایه‌های مخچه می‌گردد و با استفاده از شیر سویا (به میزان بالا) باعث افزایش غلظت سرمی β -۱۷ استرادیول در خون شده که متعاقباً سبب افزایش ضخامت لایه و تعداد سلول‌ها می‌شود. بنابراین شیر سویا می‌تواند به عنوان منبع فیتواستروژن جانشین هورمون‌های مصنوعی مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: مطالعه‌ی هیستومورفومتریک، برداشت تخمدان، موش صحرایی، شیر سویا، مخچه

مقدمه

محصولات تخمیری سویا به حساب می‌آیند و به شکل‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. تحقیقات اخیر نشان داده است که لوبیای سویا تنها حبوباتی است که پروتئین موجود در آن در مقایسه با سایر حبوبات، بسیار شبیه به پروتئین‌های حیوانی بوده و می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای گوشت مورد استفاده قرار گیرد. سویا هم‌چنین حاوی مقادیر قابل توجهی املاح معدنی از جمله کلسیم، آهن، سدیم، پتاسیم، روی و فسفر است

امروزه در بسیاری از غذاهای آماده، از فراورده‌های سویا برای بهبود کیفیت و افزایش ارزش پروتئینی آن استفاده می‌شود. به طور کلی محصولات سویا را می‌توان به دو دسته‌ی بزرگ محصولات تخمیری و غیرتخمیری تقسیم کرد. لوبیای سبز سویا، تنقلات سویا مثل آجیل سویا، جوانه‌ها، شیر سویا و تافو از جمله محصولات غیرتخمیری سویا هستند؛ در حالی که محصولاتی از قبیل سس سویا، تمپه، میسو، ناتو و تافوی تخمیری از دسته

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: mtadjalli6@yahoo.com

*۱ استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شیراز

۲ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شیراز

۳ دانشجوی دکتری تخصصی بافت شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شیراز

(Bernstein et al. 2007). سویا محتوی مقدار زیادی ایزوفلاون است که از خانواده‌ی فیتواستروژن‌هاست. فیتواستروژن‌ها از نظر ساختمانی شبیه ۱۷-بتا استرادیول می‌باشند و به سبب دارا بودن اثرات سودمند در تندرستی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (Cederroth and Nef 2009). میزان فیتواستروژن موجود در فراورده‌های شیر سویا حدود ۰/۱ تا ۲ میلی‌گرم به ازای هر گرم پروتئین است. از طرفی، چون سویا منبع غنی هورمون استروژن است، بنابراین می‌تواند جانشین هورمون‌های مصنوعی در دوران یائسگی گردد (Bhathena and Velasquez 2002). تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که استروژن دارای خاصیت حفاظتی برای سلول‌های عصبی است و خصوصیات حفاظتی آن شامل افزایش تکثیر سلولی، افزایش انتقال سیناپسی، اثر آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های ترمیمی است (Garcia-Segura and Azcoitia 2001). هم‌چنین خاصیت حفاظت نورونی بر نورون‌های آمیگدال، هیپوکامپ، قشر مغز و هیپوتالاموس توسط ایزوفلاون‌های سویا ثابت شده است (Lihong and Edwin 2005). دست‌کاری در هورمون‌های استروئیدی جنسی در ابتدای تولد، می‌تواند روی الگوهای خاص تکامل مخچه تأثیرگذار باشد و برداشت تخمدان در موش‌های صحرایی نوزاد، موجب اختلال در روند تکامل مخچه می‌گردد (Litteria 1994, Veyrac and Bakker 2010). بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر شیر سویا به عنوان منبع فیتواستروژن بر تغییرات هیستومورفومتریک مخچه ناشی از برداشت تخمدان می‌باشد.

مواد و روش کار

موش‌های صحرایی ماده‌ی یک روزه‌ی نژاد Sprague-Dawley در شرایط استاندارد آزمایشگاهی شامل ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه‌ی حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و تا پایان سه هفتگی (روز ۲۱) با شیر مادر و سپس با پلت‌های تجاری تغذیه

گردیدند. در سن یک هفتگی (روز هفتم) به طور تصادفی تعداد ۲۰ قطعه موش انتخاب و تحت عمل جراحی برداشت تخمدان (OVX) قرار گرفتند. هم‌چنین ۵ قطعه موش نیز به عنوان گروه شاهد (sham) جراحی شدند و ۵ موش باقی‌مانده به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سپس درمان سه گروه از موش‌های OVX در ۱۴ روزگی توسط شیر سویا انجام گرفت.

گروه‌بندی موش‌ها عبارت است از: ۱- گروه کنترل: بدون برداشت تخمدان و بدون دریافت شیر سویا؛ ۲- گروه برداشت تخمدان (OVX): بدون دریافت شیر سویا؛ ۳- گروه شاهد (sham): در این گروه شکم موش‌ها باز شده و فقط دست‌کاری تخمدان انجام گرفت، اما تخمدان برداشته نشد؛ ۴- گروه برداشت تخمدان با دریافت شیر سویا به میزان 0.75 ml / kg BW ، دو بار در روز با استفاده از گاواژ؛ ۵- گروه برداشت تخمدان با دریافت شیر سویا به میزان 1.5 ml / kg BW ، دو بار در روز با استفاده از گاواژ؛ ۶- گروه برداشت تخمدان با دریافت شیر سویا به میزان 3 ml / kg BW ، دو بار در روز با استفاده از گاواژ.

فراورده‌ی تجاری شیر سویا (مکسوی) توسط کارخانه‌ی سویا سان تولید شده است که حاوی ایزوفلاون بوده و فاقد کلسترول می‌باشد و در هر صد گرم این شیر، ۲/۵ گرم پروتئین وجود دارد. در پایان دو ماهگی (روز ۶۰) تمامی حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و برای اندازه‌گیری استروژن سرمی از قلب آن‌ها خون‌گیری به عمل آمد. سرم خون در صفر درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس اندازه‌گیری استروژن با استفاده از روش الایزا و کیت Biosource بر اساس واحد pg/ml انجام گرفت و متعاقب خون‌گیری و مرگ بدون درد، جمجمه‌ی موش‌ها در هر پنج گروه، جدا گردیده و به وسیله‌ی سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد و جهت سخت شدن بافت نرم مغز، ابتدا کل جمجمه در ظروف دردار حاوی فرمالین $10 \times$ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت؛

مولکولار و پورکینژ ماده‌ی خاکستری و نیز ماده‌ی سفید مخچه در شش گروه مورد مطالعه در نمودارهای ۱ الی ۸ نشان داده شده است. همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد، ضخامت لایه‌ی مولکولار در گروه ۳ در مقایسه با گروه کنترل کم‌تر است که این کاهش معنی‌دار نیست. ضخامت این لایه در گروه‌های ۵ و ۶ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$)؛ در حالی که ضخامت لایه‌ی مولکولار مخچه در گروه ۴ که شیر سویای کم‌تری دریافت نمودند، نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (تصویر ۱). نمودار ۲ نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های عصبی و نورگلی در لایه‌ی مولکولار در گروه ۶ نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری دارد ($P < 0/05$) و در تعداد سلول‌های عصبی و نورگلی این لایه در گروه ۳ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$). در حالی که در تعداد سلول‌های عصبی و نورگلی این لایه در گروه‌های ۴ و ۵ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود (تصویر ۱). همان‌گونه که در نمودار ۳ مشاهده می‌گردد، در ضخامت لایه‌ی گرانولار مخچه در گروه‌های فاقد تخمدان، هم موش‌هایی که شیر سویا دریافت نمودند (گروه ۳) و هم موش‌هایی که شیر سویا را دریافت نموده بودند (گروه‌های ۴، ۵ و ۶) نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

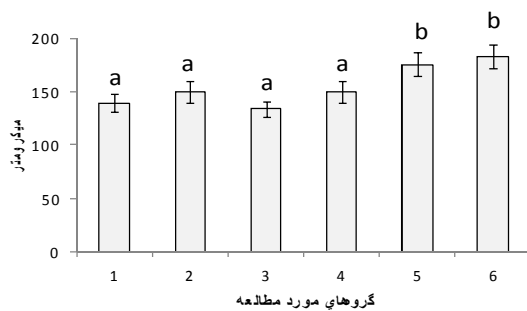
با بررسی نمودار ۴ معلوم گردید، تعداد سلول‌های لایه‌ی گرانولار مخچه در گروه ۳ در مقایسه با سایر گروه‌های مورد مطالعه دارای کاهش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$). از طرفی، در تعداد سلول‌های این لایه، در گروه ۶ نسبت به سایر گروه‌ها، افزایش معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0/05$) که خود اثر شیر سویا با دوز بالا را روی تعداد سلول‌های لایه‌ی گرانولار نشان می‌دهد (تصویر ۱). نمودار ۵ و ۶ به ترتیب مربوط به اندازه و تعداد سلول‌های پورکینژ مخچه در شش گروه مورد مطالعه

سپس استخوان‌های مجسمه و پرده‌ی مننژ هر نمونه به‌دقت برداشته شد و با جدا نمودن مخچه، نمونه‌ها پس از کدگذاری در بافر فرمالین ۴ درصد در یخچال نگهداری می‌شدند. پس از فرایند بافتی و قالب‌گیری، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون به صورت سریال تهیه گردید. سپس از لام‌های آماده شده، در فواصل معین تعدادی لام انتخاب شده و با رنگ‌آمیزی متداول همتوکسیلین - ائوزین، رنگ‌آمیزی شدند.

مطالعه‌ی هیستومورفومتریک که شامل اندازه‌گیری ضخامت لایه‌های گرانولار و مولکولار در ماده‌ی خاکستری مخچه، ضخامت ماده‌ی سفید مخچه و اندازه‌ی سلول‌های پورکینژ است، در زیر میکروسکوپ نوری توسط روش استاندارد میکرومتری با استفاده از میکرومتر مدرج چشمی و شیئی انجام گرفت. برای شمارش تعداد سلول‌ها در لایه‌های گرانولار، مولکولار و پورکینژ ماده‌ی خاکستری مخچه از گراتیکول شطرنجی استفاده گردید؛ به قسمی که در هر مقطع بافتی ده ناحیه به صورت تصادفی مشخص و شمارش و میانگین سلول‌ها در هر میلی‌متر مربع محاسبه شد. در ضمن اندازه‌گیری‌ها و شمارش سلولی در هر نمونه از هر گروه مورد آزمایش در ده مقطع بافتی انجام گرفت. برای بررسی داده‌ها از برنامه‌ی آماری SPSS-18 استفاده گردید. مقایسه‌ی گروه‌ها توسط روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تشخیصی Tukey انجام شد. سطح معنی‌داری $p < 0/05$ برای تمامی مقایسه‌ها در نظر گرفته شده و داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان گردیدند.

نتایج

در این تحقیق مشخص گردید که با برداشت تخمدان در موش‌های صحرایی نوزاد، میزان غلظت سرمی β -17 استرادیول کاهش یافته ولی با تجویز شیر سویا به میزان ۳ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن افزایش می‌یابد. هم‌چنین نتایج هیستومورفومتریک لایه‌های گرانولار،

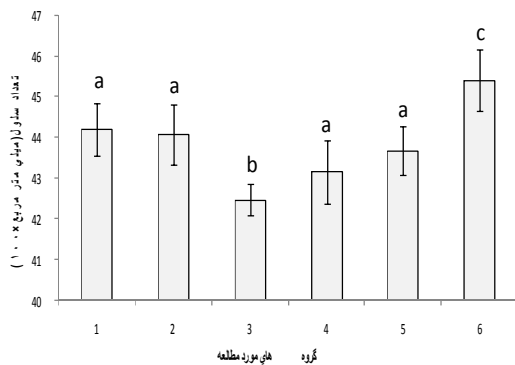


نمودار ۱: مقایسه‌ی ضخامت لایه‌ی مولکولار مخچه

(میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه

حروف لاتین غیر مشابه نشان دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد.

۱: کنترل؛ ۲: شاهد؛ ۳: برداشت تخمدان بدون دریافت شیر سویا؛ ۴: برداشت تخمدان با دریافت شیر سویا به میزان ۰/۷۵ میلی‌لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن (۲ بار در روز)؛ ۵: برداشت تخمدان با دریافت شیر سویا به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن (۲ بار در روز)؛ ۶: برداشت تخمدان با دریافت شیر سویا به میزان ۳ میلی‌لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن (۲ بار در روز)
(توضیح فوق شامل سایر نمودارها نیز می‌باشد.)



نمودار ۲: مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لایه‌ی مولکولار مخچه

(میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه

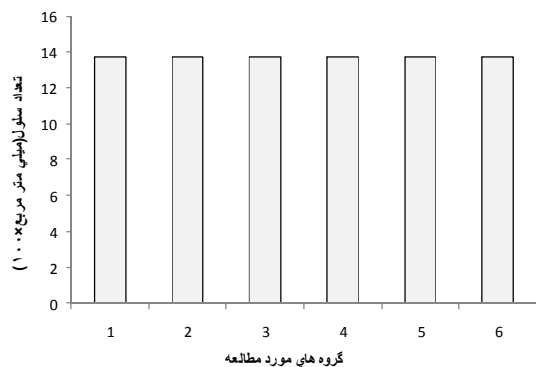
حروف لاتین غیر مشابه نشان دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد.

می‌باشد. همان طوری که نمودار ۵ نشان می‌دهد، هر چند که اندازه‌ی سلول‌های پورکینز در گروه‌های ۳ و ۴ نسبت به سایر گروه‌ها کمتر و در گروه ۶ در مقایسه با سایر گروه‌های مورد مطالعه بیشتر است، ولی این تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد؛ بنابراین حذف تخمدان و مصرف شیر سویا تفاوت معنی‌داری در اندازه‌ی سلول‌های پورکینز مخچه نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد نخواهد داشت (تصویر ۲).

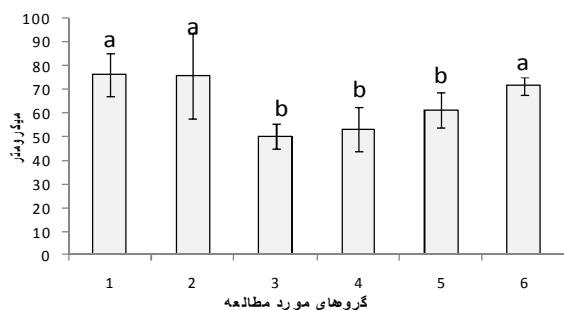
با توجه به نمودار ۶ در ارتباط با تعداد سلول‌های پورکینز مخچه در گروه‌های مورد مطالعه مشخص گردید که تعداد سلول‌های پورکینز در تمام این گروه‌ها یکسان بوده و تفاوتی بین آن‌ها یافت نمی‌شود؛ بنابراین حذف تخمدان و مصرف شیر سویا در تعداد سلول‌های پورکینز نیز بی‌تأثیر است.

همان طور که در نمودار ۷ مشاهده می‌گردد، ضخامت ماده‌ی سفید مخچه در گروه‌های ۳، ۴ و ۵ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد ($P < 0/05$)؛ در حالی که تفاوت معنی‌داری بین ضخامت ماده‌ی سفید مخچه در گروه ۶ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد وجود ندارد.

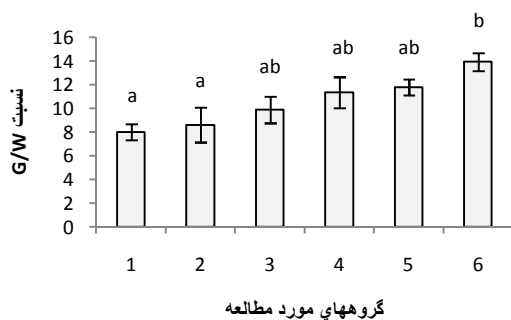
نمودار ۸ نشان می‌دهد که نسبت ضخامت ماده‌ی خاکستری به ماده‌ی سفید مخچه در گروه‌های ۳، ۴ و ۵ در مقایسه به گروه‌های کنترل و شاهد افزایش یافته ولی معنی‌دار نیست؛ در حالی که نسبت ضخامت ماده‌ی خاکستری به ماده‌ی سفید مخچه در گروه ۶ در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد دارای افزایش معنی‌دار است ($P < 0/05$).



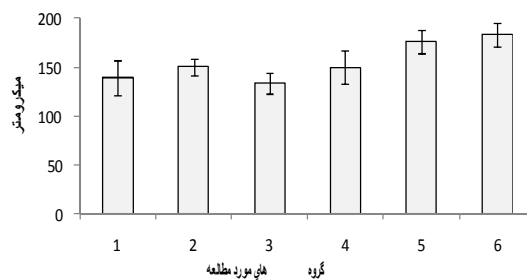
نمودار ۶: مقایسه‌ی تعداد سلول‌های پورکینز مخچه (میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه بین گروه‌های آزمایشی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) مشاهده نشد.



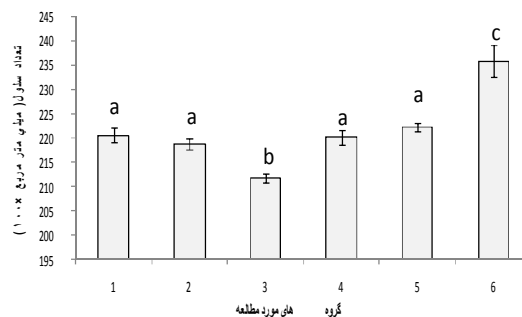
نمودار ۷: مقایسه‌ی ضخامت ماده‌ی سفید مخچه (میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد.



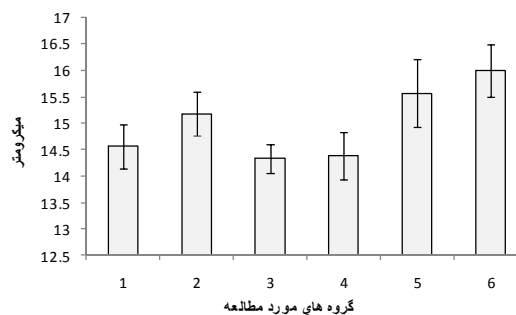
نمودار ۸: مقایسه‌ی نسبت ماده‌ی خاکستری به ماده‌ی سفید مخچه (میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد.



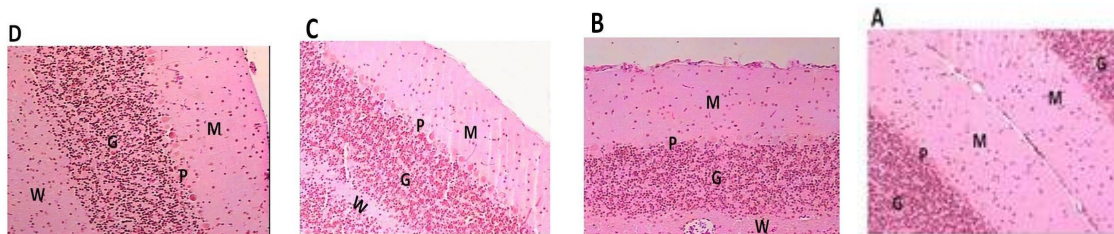
نمودار ۳: مقایسه‌ی ضخامت لایه‌ی گرانولار مخچه (میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه بین گروه‌های آزمایشی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) مشاهده نشد.



نمودار ۴: مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لایه‌ی گرانولار مخچه (میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد.

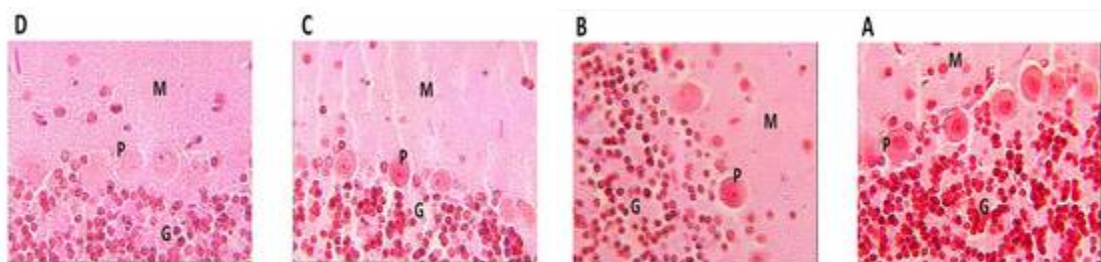


نمودار ۵: مقایسه‌ی اندازه‌ی سلول‌های پورکینز مخچه (میانگین ± خطای معیار) در گروه‌های مورد مطالعه بین گروه‌های آزمایشی اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) مشاهده نشد.



تصویر ۱: فتو میکروگراف بخشی از مخچه در موش صحرائی (رنگ آمیزی H&E 180x).

(G) لایه‌ی گرانولار (P) لایه‌ی سلول‌های پورکینز، نشان‌دهنده‌ی تغییرات هیستومورفومتریک مبنی بر کاهش ضخامت لایه‌ی مولکولار (M) در گروه برداشت تخمدان بدون دریافت شیر سویا (C) و افزایش ضخامت این لایه در گروه برداشت تخمدان با تجویز شیر سویا به میزان ۳ میلی‌لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن (D) در مقایسه با گروه‌های کنترل (A) و شاهد (B).



تصویر ۲: فتومیکروگراف بخشی از مخچه در موش صحرائی (رنگ آمیزی H&E 720x).

(M) لایه‌ی مولکولار (G) لایه‌ی گرانولار نشان‌دهنده‌ی کاهش اندازه‌ی سلول‌های پورکینز (P) در گروه برداشت تخمدان بدون دریافت شیر سویا (C) و افزایش اندازه‌ی آن‌ها در گروه برداشت تخمدان با تجویز شیر سویا به میزان ۳ میلی‌لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن (D) در مقایسه با گروه‌های کنترل (A) و شاهد (B).

بحث

عمدتاً به صورت سولفات غیرفعال هستند. آن‌ها پیشنهاد کردند که بعضی ایزوفلاون‌ها ممکن است مسیر کاتابولیسم استروژن را تعدیل نمایند (Wood et al. 2007). تغذیه با غذاهای غنی از فیتواستروژن باعث افزایش چشم‌گیر غلظت ایزوفلاون در پلاسما خون می‌شود (Weber et al. 2001). هم‌چنین در تحقیقی که در مورد غلظت ایزوفلاون پلاسما خون در انسان انجام شد مشخص گردید میزان آن پس از مصرف غذاهای فاقد سویا، کم‌تر از ۴۰ نانومولار است (Morton et al. 1994); در حالی که غلظت آن پس از مصرف غذاهای سویادار افزایش یافته و به حد میکرومولار می‌رسد (Adlercreutz et al. 1993). فیتواستروژن‌های مشتق شده از سویا، بر نوروهای مغزی موش‌های نژاد ویستار که به صورت تجربی دچار سکت‌های ایسکمیک شده بودند، یک اثر

فیتواستروژن‌ها چون مولکول‌های مشتق شده از گیاه بوده و دارای فعالیت شبه استروژنی می‌باشند، به این اسم نام‌گذاری شده‌اند. آن‌ها دارای شباهت‌های ساختاری با استروژن پستانداران هستند (Wood et al. 2007). ایزوفلاون‌های سویا که به عنوان فیتواستروژن شناخته شده‌اند، دارای خواص استروژنی و ضد استروژنی هستند. ایزوفلاون‌ها در حال حاضر به طور گسترده به عنوان جایگزین هورمون درمانی، در درمان‌های سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cohen et al. 2007). بنابراین به نظر می‌رسد از بین رژیم‌های غذایی حاوی فیتواستروژن، ایزوفلاون‌های سویا دارای بیشترین اثرات مفید می‌باشند (Chiechi et al. 2003). Wood و همکاران گزارش کردند که رژیم غذایی حاوی ایزوفلاون منجر به کاهش ۲۶-۲۱٪ کاتابولیسم استروژن‌های گردش خون می‌شود که

است؛ در حالی که Ramezani و همکاران خاصیت حفاظتی استرادیول را روی سلول‌های پورکینز مشاهده نمودند و گزارش کردند که استرادیول باعث جبران سلول‌های پورکینز از بین رفته می‌شود (Ramezani et al. 2011). هم‌چنین ضخامت ماده‌ی سفید مخچه در موش‌های صحرایی مورد مطالعه که تخمدان آنان حذف شده بود و شیر سویا دریافت نکرده بودند، کاهش معنی‌داری نشان داد، اما Ghidoni و همکاران اختلافی در حجم ماده‌ی سفید بین استفاده‌کنندگان استروژن نسبت به کسانی که از استروژن استفاده نمی‌کردند، مشاهده نکردند (Ghidoni et al. 2006). استروژن می‌تواند اثرات مخرب اشعه‌ی گاما را که شامل تغییرات در بخش حرکتی، ساختمانی و بیوشیمیایی مخچه است، کم کند (Zorrilla Zubilete et al. 2011). استروژن درمانی سبب افزایش گردش خون در مخچه می‌گردد (Ghidoni et al. 2006) و استفاده استروژن از طریق حفره‌ی بینی در زنان یائسه باعث افزایش پرخونی عروق مخچه می‌شود (Kaya et al. 2008). مخچه غنی از گیرنده‌های استروژن است (Ghidoni et al. 2006) و حذف هورمون استروژن می‌تواند موجب اختلال در روند تکامل مخچه گردد؛ به گونه‌ای که وزن مخچه و هم‌چنین تعداد و تراکم سلول‌های لایه‌ی گرانولار در همه‌ی لوب‌ها و تعداد سلول‌های پورکینز در برخی لوب‌های مخچه نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد (Literia 1994) که آن با یافته‌ی پژوهش حاضر متفاوت است.

یافته‌های Robertson و همکاران نشان داد استروژن درمانی در طول یائسگی تفاوت تراکم ماده‌ی خاکستری مربوط به سن را تعدیل می‌کند (Robertson et al. 2009). استروژن درمانی در زنان یائسه سرعت از دست دادن ماده‌ی خاکستری مخچه و مغز را کاهش داده و احتمال ابتلا به بیماری آلزایمر را کم می‌کند (Boccardi et al. 2006). نتایج مطالعات Wang و همکاران در ارتباط با سلول‌های گرانولی مخچه‌ی موش‌های نوزاد نشان داد که استروژن به طور مستقیم بر تکامل و بلوغ

محافظتی داشته‌اند (Castell-Ruiz et al. 2011). ایزوفلاون‌ها هم‌چنین باعث تغییر مورفولوژی مغز در ناحیه‌ی پری‌اپتیک هیپوتالاموس می‌شوند؛ به طوری که ایزوفلاون گنیستین موجب افزایش حجم پری‌اپتیک می‌گردد (Faber and Hughes. 1993). استروژن قادر است شاخص‌های رفتاری اضطراب را کاهش دهد (Diaz-Veliz et al. 1997) و فیتواستروژن نیز می‌تواند در رفتارهای ضد اضطراب یک افزایش معنی‌داری ایجاد کند (Lephart et al. 2002).

پژوهش حاضر نشان داد که غلظت سرمی β -17 استرادیول در موش‌های تخمدان برداشته شده که شیر سویا را با دوز ۳ میلی‌لیتر در ازای یک کیلوگرم وزن بدن دریافت می‌نمودند، افزایش می‌یابد که ممکن است این مسئله به دلیل کاهش کاتابولیسم β -17 استرادیول باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که ایزوفلاون سویا، آگونیست β -17 استرادیول است و در دوز بالا می‌تواند میزان لازم استروژن مترشح از تخمدان را با نبود آن جبران کند. ضخامت لایه‌ی مولکولار، اندازه‌ی سلول‌های پورکینز و هم‌چنین تعداد سلول‌های لایه‌های مولکولار و گرانولار در مخچه‌ی موش‌های صحرایی تخمدان برداشته شده که شیر سویا دریافت نمی‌کردند، کاهش یافته است که با یافته‌های Ghidoni و همکارانش در سال ۲۰۰۶ هم‌خوانی دارد. Ghidoni و همکاران گزارش کردند که بخشی از حجم لوب‌های مخچه مربوط به ماده‌ی خاکستری در بین استفاده‌کنندگان استروژن نسبت به کسانی که استروژن دریافت نکردند، افزایش معنی‌داری مشاهده می‌شود (Ghidoni et al. 2006). ولی پژوهش حاضر افزایش معنی‌داری را در ضخامت لایه‌ی مولکولار و هم‌چنین تعداد سلول‌ها در لایه‌های مولکولار و گرانولار و نسبت ضخامت ماده‌ی خاکستری به ماده‌ی سفید در ارتباط با موش‌های صحرایی تخمدان حذف شده که شیر سویا را در دوز بالا (۳ میلی‌لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) دریافت نمودند، نشان داد. از طرفی، حذف تخمدان و مصرف شیر سویا در تعداد سلول‌های پورکینز بی‌تأثیر

(Rabbani et al. 1997). یافته‌های کلینیکی نشان داد که میزان بهبودی زنان نسبت به مردان بعد از آسیب‌های مغزی ناشی از تروما بیشتر است (Groswasser et al. 1998).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیقات قبلی مبنی بر تأثیر هورمون‌های استروئیدی جنسی در ابتدای تولد روی تکامل مخچه و نیز این که برداشت تخمدان در موش‌های صحرایی نوزاد موجب اختلال در روند تکامل مخچه می‌گردد و از طرفی سویا منبع غنی از هورمون استروژن است و خاصیت حفاظت نورونی روی سیستم عصبی مرکزی دارد، با استناد به پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که کم شدن استروژن ناشی از برداشت تخمدان در موش‌های صحرایی نوزاد (۷ روزه) موجب کاهش ضخامت و تعداد سلول‌ها در بیشتر لایه‌های مخچه می‌گردد؛ به عبارت دیگر، استفاده از شیر سویا به میزان زیاد (۳ میلی‌لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) باعث افزایش غلظت سرمی β -17 استرادیول در خون شده که متعاقباً سبب افزایش ضخامت لایه، تعداد سلول‌ها و نسبت ماده‌ی خاکستری به ماده‌ی سفید در مخچه می‌گردد. بنابراین شیر سویا می‌تواند به عنوان منبع فیتواستروژن جانشین هورمون‌های مصنوعی شود.

مخچه تأثیر می‌گذارد (Wang et al. 2003). با افزایش سن، میزان استروژن کاهش می‌یابد که آن خود دلیل اختلالات شناختی در اثر افزایش سن در جوانان ماده نسبت به جوانان نر خواهد بود (Frick et al. 2000, Markowska 1999).

در گزارش Simpkins و همکاران ثابت گردید که هورمون بتا استرادیول، میزان مرگ و میر را در موش‌هایی که شریان مغزی میانی آنان مسدود گشته، کاهش می‌دهد (Simpkins et al. 1997). هم‌چنین Dubal و همکاران پی بردند که استرادیول سیستمیک باعث کاهش قابل توجهی در سکتی مغزی می‌شود (Dubal et al. 1998) و Toung و همکاران نیز گزارش نمودند که هورمون بتا استرادیول بر مغز موش‌های نر که به وسیله مسدود شدن شریان مغزی میانی دچار سکتی شده بودند، یک اثر محافظتی دارد و اخته کردن موش‌های نر که به طور تجربی دچار سکتی شده‌اند، تأثیری بر نوروهای آسیب دیده ندارد؛ در حالی که با جایگزینی هورمون استروژن، این آسیب‌پذیری کاهش می‌یابد (Toung et al. 1998). Sudo و همکاران گزارش کردند که تزریق هورمون بتا استرادیول به داخل بطن‌های جانبی مغز، مانع ایسکمی در بخش قدامی مغز می‌شود، ایسکمی باعث ناتوانی در یادگیری و از دست رفتن نوروها در مراحل اولیه می‌گردد (Sudo et al. 1997). از دیگر شواهد مبنی بر اثر حفاظتی هورمون بتا استرادیول، نقش محافظتی این هورمون بر نوروهای کولینرژیک در مغز قدامی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه شیراز به دلیل حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Adlercreutz, H.; Fotsis, T.; Lampe, J.; Wahala, K.; Makela, T.; Brunow, G. et al. (1993). Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry.

Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation. 215 (Suppl.), 5-18.

Bernstein, A.; Treyzon, L. and Li, Z. (2007). Are High-Protein, Vegetable-Based Diets Safe for Kidney Function? American Journal of Diet Association. 107: 644-650.

- Bhathena, S.J. and Velasquez, M.T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 1191-1201.
- Boccardi, M.; Ghidoni, R.; Govoni, S.; Testa, C.; Benussi, L.; Bonetti, M. et al. (2006). Effects of hormone therapy on brain morphology of healthy postmenopausal women: a Voxel-based morphometry study. *Journal of Menopause*, 13(4): 584-591.
- Bu, L. and Lephart, E.D. (2005). Soy isoflavones modulate the expression of BAD and neuron-specific beta III tubulin in male rat brain. *Neuroscience Letters*, 385:153-157.
- Castell-Ruiz, M.; Torregrosa, G.; Burguete, M.C.; Salom, J.B.; Gil, J.V.; Miranda, F.J. et al. (2011). Soy-derived phytoestrogens as preventive and acute neuroprotectors in experimental ischemic stroke: Influence of rat strain. *Phytomedicine* 18: 513-515.
- Cederroth, C.R. and Nef, S. (2009). Soy phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304: 30-42.
- Chiechi, L.M.; Putignano, G.; Guerra, V.; Schiavelli, M.P.; Cisternino, A.M. and Carriero, C. (2003). The effect of a soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. *Maturitas*. 45(4): 241-246.
- Cohen, L.A.; Crespin, J.S.; Wolper, C.; Zang, E.A.; Pittman, B.; Zhao, Z. et al. (2007). Soy isoflavone intake and estrogen excretion patterns in young women: effect of probiotic administration. *In Vivo*. 21(3): 507-512.
- Diaz-Veliz, G.; Alarcon, T.; Espinoza, C.; Dussaubat, N. and Mora, S. (1997). Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. *Pharmacological Biochemical Behavior*, 58: 637-642.
- Dubal, D.B.; Kashon, M.L.; Pettigrew, L.C.; Ren, J.M.; Finklestein, S.P.; Rau, S.W. et al. (1998). Estradiol protects against ischemic injury. *Journal of Cerebellar Blood Flow and Metabolism*. 18:1253-1258.
- Faber, K.A. and Hughes Jr, C.L. (1993). Dose-response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postpubertal castrated female rats, *Reproductive Toxicology*. 7: 35-39.
- Frick, K.M.; Burlingame, L.A.; Arters, J.A. and Berger-Sweeney, J. (2000). Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/ 6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*. 95: 293-307.
- Garcia-Segura, L.M. and Azcoitia, I. and Don Carlos, L.L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*. 63:29-60.
- Ghidoni, R.; Boccardi, M.; Benussi, L.; Testa, C.; Villa, A.; Pievani, M. et al. (2006). Effects of estrogens on cognition and brain morphology: Involvement of the cerebellum. *Maturitas*. 54:222-228.
- Groswasser, Z.; Cohen, M. and Keren, O. (1998). Female TBI patients recover better than males. *Brain Injury*. 12: 805-808.
- Kaya, E.; Sahin, F.K.; KoKen, G.; Kose, M. and Cevrioglu, A.S. (2008). Acute effect of intranasal estrogen on cerebral and cerebellar perfusion in postmenopausal women. *Maturitas*. 59: 72-82.
- Lephart, E.D.; West, T.W.; Weber, K.S.; Rhees, R.W.; Setchell, K.; Adlercreutz, H. et al. (2002). Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicology and Teratology*, 24:5-16.
- Litteria, M. (1994). Long-term effects of neonatal ovariectomy on cerebellar development in the rat: a histological and morphometric study. *Brain Resear Ch. Developmental Brain Research*, 81:113-120.
- Markowska, A.L. (1999). Sex dimorphism in the rate of age-related decline in spatial memory: relevance to alterations in the estrous cycle. *Journal of Neuroscience*, 19: 8122-8133.
- Morton, M.S.; Wilcox, G.; Wahlqvist, M.L. and Griffiths, K. (1994). Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation. *Journal of Endocrinology*, 142: 251-259.
- Rabbani, O.; Panickar, K.S.; Rajakumar, G.; King, M.A.; Bodor, N.; Meyer, E.M. and Simpkins, J.W. (1997). 17beta-estradiol attenuates fimbrial lesion-induced decline of ChAT-immunoreactive neurons in the rat medial septum. *Experimental Neurology*, 146: 179-186.
- Ramezani, A.; Goudarzi, I.; Lashkarbolouki, T.; Ghorbanian, M.T.; Salmani, M.E. and Abrari, K. (2011). Neuroprotective effects of the 17β-estradiol against ethanol-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological and behavioral changes. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 100(1): 144-151.

- Robertson, D.; Craig, M.; Amelvoort, T.; Daly, E.; Moore, C.; Simmons, A. et al. (2009). Effects of estrogen therapy on age-related differences in gray matter concentration. *Climacteric*. 12 (4): 301-309.
- Simpkins, J.W.; Green, P.S.; Gridley, K.E.; Singh, M.; DeFiebre, N.C. and Rajakumar, G. (1997). Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine*, 103:19S– 25S.
- Sudo, S.; Wen, T.C.; Desaki, J.; Matsuda, S.; Tanaka, J.; Arai, T. et al. (1997). Beta-estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neuroscience Research*, 29: 345–354.
- Toung, T.J.; Traystman, R.J. and Hurn, P.D. (1998). Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke*, 29:1666–1670.
- Veyrac, A. and Bakker, J. (2010). Postnatal and adult exposure to estradiol differentially influences adult neurogenesis in the main and accessory olfactory bulb of female mice. *FASEB Journal*, 25: 1048-1057.
- Wang, L.; Andersson, S.; Warner, M. and Gustafsson, J.A. (2003). Estrogen receptor (ER) β knockout mice reveal a role for ER β in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100 (2): 703-708.
- Weber, K.S.; Setchell, K.D.; Stocco, D.M. and Lephart, E.D. (2001). Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *Journal of Endocrinology*. 170: 591-599.
- Wood, C.E.; Register, T.C. and Cline, J.M. (2007). Soy isoflavonoid effects on endogenous estrogen metabolism in postmenopausal female monkeys. *Carcinogenesis*, 28 (4): 801-808.
- Zorrilla Zubilete, M.A.; Guelman, L.; Maur, D.G.; Caceres, L.G.; Rois, H.; Zieher, L.M. et al. (2011). Partial neuroprotection by 17-beta-estradiol in neonatal gamma-irradiated rat cerebellum. *Neurochemistry International*. 58:273–280.

Effect of soy milk on histomorphometric changes of cerebellum in neonatal ovariectomized rats

Tadjalli, M.¹; Taherian Fard, M.² and Astaneh, M.E.³

Received: 9.03.2013

Accepted: 6.07.2013

Abstract

Soy milk contains isoflavones that comprise the phytoestrogen families. The phytoestrogens are molecules derived from plants that have estrogen-like activity. They have structural similarities with mammalian estrogen. This study was done to investigate effect of soy milk on histomorphometric changes of cerebellum in neonatal ovariectomized rats. For this study, 30 female rats (one-day-old) were kept in standard laboratory conditions. Then 20 rats (one-week-old) were randomly selected and underwent surgical removal of the ovaries (OVX). Five rats were served for sham surgery, and the rest of 5 rats were considered as control study. The three OVX groups were treated on 14 days of age by soy milk (0.75 ml/kg), 1.5 ml/kg and 3 ml/kg respectively 2 times per day. At the end of two months, all rats were euthanized, blood samples were collected and the cerebellum was dissected and fixed in 10% formalin. Serial sections were obtained from prepared blocks and stained by H&E that were studied by light microscopy. Cerebellar histomorphological features included; measuring the thickness of the granular, molecular layers and Purkinje cells size in cerebellum gray matter, counting the cell number in these layers, estimating the thickness of the white matter, comparison of gray matter to the white matter in the cerebellum. According to this study, low estrogen level due to ovariectomized infant rats have reduced the thickness and cell number in most layers of the cerebellum. But, feeding high level of soy milk to ovariectomized infants induced high serum concentrations of 17- β estradiol that subsequently increased thickness and cells numbers of the cerebellum. Therefore the soy milk can be used as a source of synthetic hormone replacement.

Key words: Histomorphometric study, Ovariectomized, Rat, Soy milk, Cerebellum

1- Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Iran

2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Iran

3- PhD Student of Anatomical Sciences from Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Iran

Corresponding Author: Tadjalli, M., E-mail: mtadjalli6@yahoo.com