تأثير فول الصويا Glycine Max في مستوى بعض الهرمونات الستيرويدية وبعض المعايير الفسلجية في إناث الفئران البيض.

رسمية حياوي مراد عالية حسين علي
قسم علوم الحياة– كلية العلوم للبنات
جامعة بغداد

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة تأثير فول الصويا في مستوى بعض الهرمونات الستيرويدية (Estrogen, Progesterone) وكذلك هرمونات الغدة النخامية (LH, FSH) وفي العد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض والتركيب النسيجي للمبايض وقد استخدم في الدراسة 30 أنثى من الفئران البيض والتي قسمت إلى مجموعتين متساويتين، إذ تم تغذية المجموعة الأولى على نوع خاص من العلف حضر في المختبر من خلال إضافة فول الصويا عند التحضير كمصدر للبروتين وبنسبة 20% من العليقة، أما المجموعة الثانية فقد مثلت مجموعة السيطرة التي تم تغذيتها على نفس النوع من العليقة بدون إضافة فول الصويا. استمرت التغذية لمدة شهرين متتالين بعدها تم سحب دم من القلب مباشرة وبطريقة طعنة القلب لغرض إجراء الفحص الخاص بالعدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض وقياس مستوى الهرمونات الستيرويدية وهرمونات الغدة النخامية ومن ثم تم تشريح الحيوانات من أجل تحضير المقاطع النسيجية للمبايض وقد أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية $P<0.05$ في مستوى الهرمونات المدروسة وكذلك وجود زيادة معنوية في $P<0.05$ في العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض كما وأظهرت الدراسة النسيجية وجود زيادة معنوية في عدد الجريبات المبيضية المتطورة وفي جميع المراحل.

الكلمات مفتاحية: فول الصويا، الهرمونات الستيرويدية، هرمونات الغدة النخامية، العدد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض.

Effect of soya been *Glycine Max* on the level of some steroidal hormones and some physiological parameters in female albino mice:

Rasmiya H. Murad **Alia Hussein Ali**

Department of biology/ College of sciences for women/ university of Baghdad

Abstract

The aim of this search is to know the effect of *Glycin man* on the level of steroidal hormones (Estrogen , Progesterone). The study also measuring the pituitary gland hormones, the follicle stimulating hormone (FSH) and the luteinizing hormone the effect of *Glycin max* on the total white blood cell count and the differential white blood cell count and also the effect on the number of follicles in the ovaries. In this study we used 30 adult female mice divided in to two groups, the first group fed a diet containing 20% of *Glycin max* as a protein source while the second group fed a diet without the *Glycin max* the experiment continue for two months after the end of the experiment, the blood samples were collected from each mice by heart puncture to study the effect of the *Glycin max* on the previously mentioned parameter in addition that ovaries were removed for histopath. The effect of the *Glycin max* on the studied parameters is Significant (P<0.05) increase in the Estrogen and Progesterone level, Follicle stimulating hormone (FSH), Luteinizing hormone (LH), the number of the growing follocles, and the number of the total and differential count of the white blood cell count.

Key wards: *Glycine Max*, Steroidal hormones, Pituitary hormones and Blood parameters.

المقدمة

يعد فول الصويا من النباتات المهمة غذائياً لأنه يحتوي على العديد من الأحماض الأمينية الأساسية التي يحتاجها الجسم لبناء البروتينات (15)، وفضلاً عن ذلك فأن فول الصويا يعد مصدراً هاماً للاستروجينات النباتية والتي تماثل في فعاليتها وتركيبها الكيميائي ووزنها الجزيئي للأستروجين الحيواني (17؛ 8). ولقد أشار (10) إلى وجود مجموعتين من الأستروجينات النباتية هما: ثنائي الفينول Diphenolics (الشبيهة بالأستروجين) والكلايكوسيدات الأيزوفلافون Glycosides Isoflavone والتي تضم كلاً من Coumesterol, Nistein, Daidzein، وقد وجد بأن مركبات الأيزوفلافون المعزولة من فول الصويا تظهر فعالية مضادة للأكسدة التي ربما ترتبط بفعاليته المضادة للسرطان والالتهاب (20) و فضلاً عن ذلك فقد تم استخلاص مزيج من مركبات Glyceollins I,II,III من نبات فول الصويا والتي أثبتت الدراسات التي اجريت في داخل الجسم الحي والزجاج (in vitro) أمتلاك هذا المركب فعالية مضادة للاستروجين في الخلايا السرطانية، اذ ترتبط مع مستقبلات الأستروجين وبأنه يمتلك فعالية دوائية خاصة وهي منع استحثاث الأستروجين (20)، و يوجد في الجسم نوعين من مستقبلات الأستروجين هما Alpha و Beta وتعد المستقبلات من نوع Beta أكثر ملائمة للأستروجينات النباتية وأن هذا النوع من المستقبلات يوجد في القلب والعظام في حين توجد المستقبلات من نوع Alpha في الرحم والثدي والبروستات لذلك يزداد حصول السرطانات ومن هنا يأتي دور الأستروجينات النباتية كمضادات أستروجينية عندما تصادف مستقبلات Alpha وبالتالي تمنع حدوث السرطان (18؛ 7) كما أن عدم التوازن في نسبة الأستروجين في الجسم له علاقة مباشرة في بعض أمراض القلب والإصابة بالسرطان، إذ أن كميات معينة منه يحتاجها الجسم للقيام بفعاليته بشكل طبيعي (11) ، وقد أثبتت البحوث بأن الاستروجين أساسي في التكوين الطبيعي لأجهزة التكاثر في كلا الجنسين (3)، لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى تحديد تأثير فول الصويا *(Glycin Max)* في مستوى بعض الهرمونات الستيرويدية كذلك هرمونات الغدة النخامية وفضلا عن العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض والتركيب النسيجي للمبايض.

المواد وطرق العمل

استخدمت في هذه الدراسة 30 فأرة بيضاء بعمر 13 أسبوع وتراوحت أوزانها بين 25–30 غم تم الحصول عليها من مركز بحوث التقنيات الأحيائية/ جامعة النهرين، اذ قسمت الحيوانات إلى مجموعتين رئيستين، زودت المجموعة الأولى بنوع خاص من العلف تم تحضيره في المختبر وذلك بإضافة 20% من فول الصويا كمصدر للبروتين للمكونات الأساسية التي يحتويها العلف الحيواني الخاص بالفئران، أما المجموعة الثانية فقد كانت تمثل مجموعة السيطرة، إذ تم تزويدها بنفس النوع من العلف بدون إضافة فول الصويا مع التأكد من عدم احتوائه على أي نسبة من فول الصويا واستمرت تغذية الحيوانات على هذا النحو ولمدة شهرين متتاليين ولقد زودت المجموعتين بالماء وبشكل مستمر ووضعتا في نفس الظروف البيئية من درجة الحرارة وفترة الإضاءة.

جمع عينات الدم:

تم قتل الحيوانات وفتح التجويف البطني بشكل حرف T مقلوب وسحب من القلب مباشرة عن طريق طعنة القلب، وبعد جمع عينات الدم تم إجراء التجارب الخاصة بالعد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض وتسجيل النتائج وفقا لما ورد في (5).

الدراسة الهرمونية:

بعد جمع عينات الدم تم قياس مستوى الهرمونات الأنثوية Follicle stimulating hormone (FSH), Estrogen, Progesterone, Estradiol Lentinizing hormone (LH) . باستخدام جهاز Minividas والذي يعتمد على اختبار كمي تلقائي ويستعمل لغرض تحديد مستوى الهرمونات في مصل أو بلازما الدم ويدعى (MIDA) وهي تمثل مختصر Minivietvic Immuno Diagnostic Assay وباستخدام العدة الخاصة بالقياس ولكل هرمون على حدة Hormonal Assay Kit وكما مذكور في (12).

الاختبارات الدموية:

تم حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض وذلك بإتباع الطريقة الموصوفة من قبل (5) واستخراج عدد خلايا الدم البيض من خلال المعادلة الآتية:

عدد خلايا الدم البيض/ملم^3.دم =

$$\frac{\text{عدد الخلايا المحسوبة في أربعة مربعات كبيرة}}{4} \times \text{عامل التخفيف} \times \text{عامل الحجم}$$

ومن أجل حساب العدد التفريقي لخلايا الدم البيض تم إتباع طريقة (5) وباستعمال المعادلة التالية:

$$\text{عدد الخلايا (خلية/ ملم}^3\text{. دم)} = \frac{\text{العدد الكلي للخلايا البيض} \times \text{النسبة المئوية للخلايا}}{100}$$

الدراسة النسيجية:

بعد أن تم تشريح الحيوانات جرى تثبيت عينات المبايض بمحلول بوين وأجريت عملية الغسل بسلسلة متصاعدة من الكحول الاثيلي (70 و 80 و 90 و 100)% وثم تم ترويقها بالزايلول وبعد ذلك تم طمرها بشمع البرافين ولغرض تحضير الشرائح استخدم جهاز القطع (rotary micro toms) كما استخدمت صبغة الهيماتوكسين ايسوين المزدوجة في تلوين الشرائح وفقاً لما وصفه (9) ومن ثم تم فحص الشرائح النسيجية باستعمال المجهر الضوئي المركب، إذ سجلت أعداد الجريبات المبيضية الابتدائية والثانوية والناضجة والأجسام الصفر.

التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات باستعمال برنامج تحليل إحصائي جاهز Social Packge Stastisical System والذي يدعى اختصارا (SPSS)، وفق التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design وتم اختبار المتوسطات وفق تحليل ANOVA اختبار F ومقارنة الفروقات المعنوية بين المتوسطات المدروسة باستعمال اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى احتمالية $P<0.05$ (2).

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج الإحصائية حصول زيادة معنوية عند مستوى (P<0.05) في العد الكلي لخلايا الدم البيض وكما هو واضح في (الجدول، 1)، إذ بلغ (10.00±1.00 خلية/ملم^3 دم) مقارنة بالسيطرة (7.33±0.57 خلية/ملم^3 دم)، أما بالنسبة للعد التفريقي للخلايا إذ أظهرت النتائج وجود زيادة في عدد الخلايا وحيدة النواة، اذ وصل عددها إلى (2.00±1.00 خلية/ملم^3 دم) مقارنة بالسيطرة (0.66±0.57 خلية/ملم^3 دم) في حين بلغ عدد الخلايا اللمفاوية (7.00±1.00 خلية/ملم^3 دم) مقارنة بالسيطرة (4.33±1.15 خلية/ملم^3 دم) ، أما الخلايا العدلة فقد بلغت(4.33±2.08 خلية/ملم^3 دم) وقد كانت السيطرة (2.33±1.15 خلية/ملم^3 دم)، وقد بلغ عدد الخلايا الحمضة (4.33±2.08خلية/ملم^3 دم) مقارنة بالسيطرة (2.33+1.15 خلية/ملم^3 دم) أما القعدة فقد بلغت (0.333±0.57 خلية/ملم^3 دم) مقارنة بالسيطرة.

وقد يرجع سبب هذه الزيادة لعدد خلايا الدم البيض لحيوانات المجموعة الأولى المعتمدة في تغذيتها على العليقة المحتوية على فول الصويا، إلى مادة الصابونين الموجودة في هذا النبات والتي يعتقد بأنها تؤثر وبشكل كبير على الجهاز المناعي وذلك من خلال تعزيز إنتاج الأجسام المضادة إذ اتضح أن مادة Quillaja هو مركب صابوني يعمل على زيادة سرعة إنتاج الخلايا المناعية للجسم (14) ولقد وجد بأن مركب الصابونين يحفز على إنتاج الحركيات الخلوية Cytokines مثل Interferones و terleukins التي تتوسط التحفيز المناعي والتي يعتقد أنها تتفاعل مع الخلايا المولدة للأجسام المضادة لتحث على الكثير من الاستجابات المناعية(6)، أما الدراسة الهرمونية فقد أوضحت وجود زيادة معنوية عند مستوى (P<0.05) وكما هو موضح في (الجدول، 2) ، إذ بلغ تركيز هرمون (FSH)(0.10±1.43) مقارنة بالسيطرة (0.06±o.75) في حين كان تركيز (LH) (0.15±0.972) مقارنة بالسيطرة (0.13±0.74) أما هرمون Estrogen فقد بلغ (4.48±49.33) مقارنة بالسيطرة (4.13±35.26)، في حين بلغ مستوى هرمون Progesterone (0.14±48.45) مقارنة بالسيطرة (0.18±0.40) ، ويمكن تفسير هذه الزيادة في مستوى الهرمونات الأنثوية للمجموعة المعتمدة في تغذيتها على علف فول الصويا إلى احتواء فول الصويا على الاستروجينات النباتية، وبحسب (1) فأن للاستروجينات النباتية تأثير في معدل نمو وتطور الجريبات المبيضية، إذ تعمل على زيادة أعدادها وصولاً إلى الجريبات الناضجة المسؤولة عن إطلاق الهرمون وكما أثبتت الدراسة التي أجراها (16) بأن

التعرض الطويل الأمد للاستروجينات النباتية يمكن أن يقوم بدور مضاد للاسترادايول مما يؤثر سلبياً في الأعضاء والأنسجة المستهدفة من هذا الهرمون ومن جهة أخرى فأن الاستروجينات تؤدي دور مهم في عملية النضج والتي تشمل الزيادة في قابلية المبيض على تكوين الجريبات المبيضية وقد أشار (10) إلى وجود مجموعتين من الاستروجينات النباتية وهما Isoflavons Glycosides و Diphenlics التي تضم Genistein و Daidzen و Coumsterol و Biochanina وبحسب (13) فأن Daidzen و Genistein يتأيضان في الأمعاء بفعل البكتريا الطبيعية (المعوية) إلى Enterolacton و Entrodiol اللذان يمثلان β /17 Estraladiol الحيواني الذي له نفس الصيغة الجزيئية والوزن الجزيئي لذلك يتنافسان للارتباط مع مستقبلات الاستروجينات والتي تكون على نوعين ER–β و ER–α ، أما (19) فقد أكد على أن تراكيز معينة من الاستروجينات النباتية والتي يمكنها تحفيز إنتاج الهرمون المحفز للجريبات (FSH) من الفص الأمامي للغدة النخامية، وهذا يتفق مع ما توصلنا إليه في الدراسة الحالية، ولقد أثبت (4) بأن ارتفاع نسبة الاستروجين والبروجستيرون يمكن أن يعزى إلى تناول الحيوانات لنباتات حاوية على الاستروجينات النباتية المماثلة في فعاليتها وتركيبها الكيميائي ووزنها الجزيئي للاستروجين والبروجستيرون الحيواني، كما تؤثر في آلية صنع الهرمونات الستيرويدية الحيوانية، إذ تستحث خلايا الطبقة الحبيبية Granulosa Cell في المبيض لإفراز هرمون البروجستيرون وزيادة إفراز الاستروجين من خلايا القراب Theca Cell بالتغذية الاسترجاعية الموجبة. ومن جهة أخرى فقد أوضحت الدراسة النسيجية وجود زيادة في معدل نمو الجريبات المبيضية النامية وكما هو موضح في (الشكل، 1) وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ما توصل إليه (1) فأن الاستروجينات النباتية لها تأثير في معدل نمو الجريبات المبيضية النامية، إذ تعمل على زيادة إعدادها كما يتضح في(الأشكال، 1، 2، 3، 4، 5، 6) اذ يلاحظ حصول زيادة في عدد الجريبات الابتدائية والثانوية والناضجة بشكل واضح وعدد الجريبات المتطورة وكما يظهر في (الشكل، 3، 4) حصول زيادة في معدل عدد الأجسام الصفر عند المقارنة بالسيطرة في (الشكل، 6) والسبب قد يعود إلى أن التركيز العالي من الاستروجينات النباتية الموجودة في فول الصويا تعمل بدور مضاد لهرمون الاستروجين وأن انخفاض مستوى هرمون β –17 Estradiol يؤدي ارتفاع مستوى LH عن طريق التغذية الاسترجاعية السالبة للغدة النخامية وهذا يؤدي إلى ارتفاع مستوى هرمون LH الذي يفرز من الفص الأمامي للغدة النخامية والمسؤول عن تغيير الخلايا الحبيبية والخلايا القرابية الداخلية في

الجريب الناضج فيزداد قطرها إلى ضعف قطر الخلية المحبب أو أكثر من ذلك الموضح في (الأشكال، 1، 3، 4) مقارنة مع السيطرة وكما هو موضح في (الشكل، 2) لمجموعة السيطرة.

وتمتلئ بمشتملات Inclusions شحمية تعطيها لوناً أصفر وتسمى هذه العملية بالتصفير Luteinization وتسمى الكتلة الكلية من الخلايا بمجموعها بالجسم الأصفر(4).

جدول (1): يبين معدل الخطأ القياسي (±) للعدد الكلي (ملم^3 × 10^3) والتفريقي % لخلايا الدم البيض للفئران البيض المعاملة بتركيز 20% من فول الصويا مع مجموعة السيطرة.

المجاميع	المعدل + الخطأ القياسي (خلية/ملم3 دم)					
	الكلي	المفية	العدلة	وحيدة النواة	الحمضة	القعدة
السيطرة	A 0.57±7.33	A 1.15±4.33	A 1.15±2.33	A 0.57±0.66	A 1.15±2.33	A 0.00±0.00
المعاملة	B 1.00±10.00	B 1.00±7.00	B 2.08±4.33	B 1.00±2.00	B 2.08±4.33	B 0.57±0.333

* تمثل الأحرف المختلفة فروقاً معنوية ($P<0.05$) بين معدلات العمود الواحد.

* تمثل الأحرف المتشابهة عدم وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين معدلات العمود الواحد.

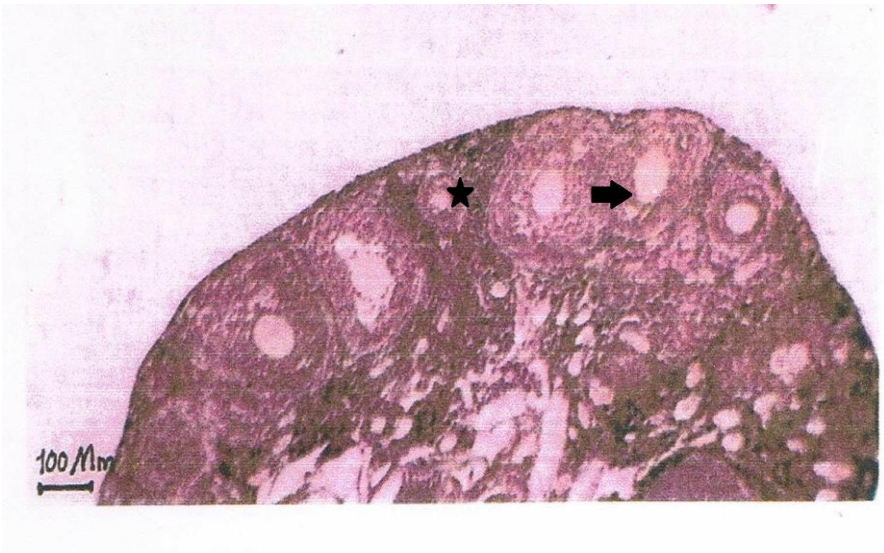
جدول (2): بين مستوى الهرمونات الأنثوية في مصل الفئران البيض المعاملة بتركيز 20% من فول الصويا مع مجموعة السيطرة.

المجاميع	المعدل + الخطأ القياسي (خلية/ملم3 دم)			
	FSH MIU/ml	LH MIU/ml	Estrogen MIU/ml	Progesterone MIU/ml
السيطرة	A 0.06±0.75	A 0.13±0.74	A 4.13±35.26	A 0.18±0.40
المعاملة	B 0.10±1.43	B 0.15±0.972	B 4.48±49.33	B 0.14±48.45

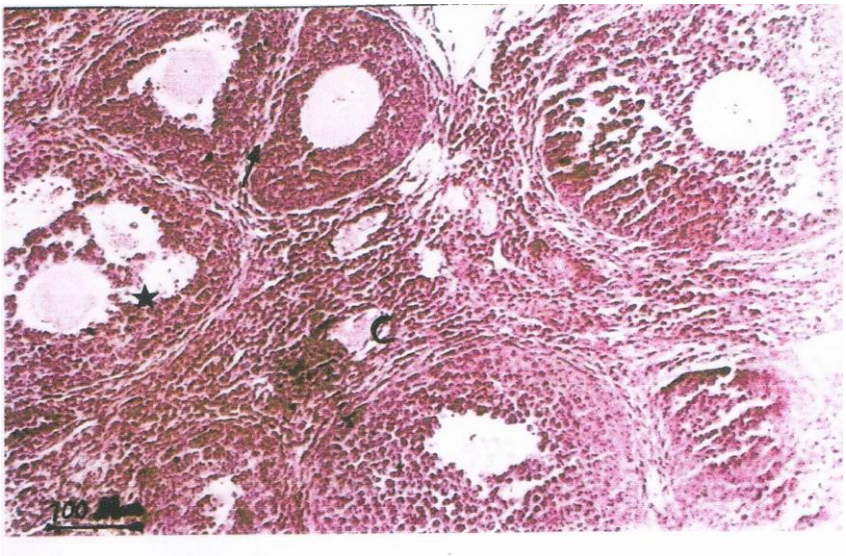
* تمثل الأحرف المختلفة فروقاً معنوية ($P<0.05$) بين معدلات العمود الواحد.

* تمثل الأحرف المتشابهة عدم وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين معدلات العمود الواحد.

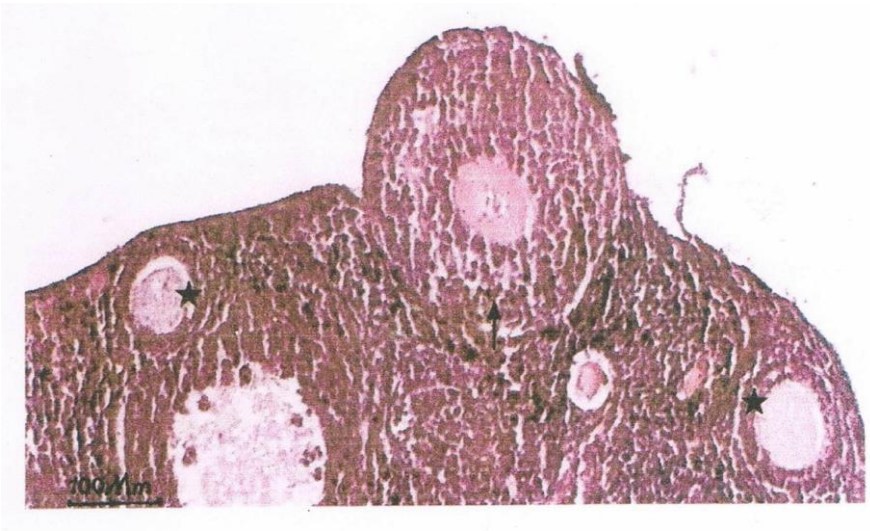
شكل (1): مقطع في مبيض فأرة من مجموعة المعاملة يظهر فيه التضخم الواسع في حجم المبيض. الزيادة الكبيرة في حجم الجريبات المبيضية. صبغة الهيماتوكسلين– ايوسين– قوة التكبير 40×.



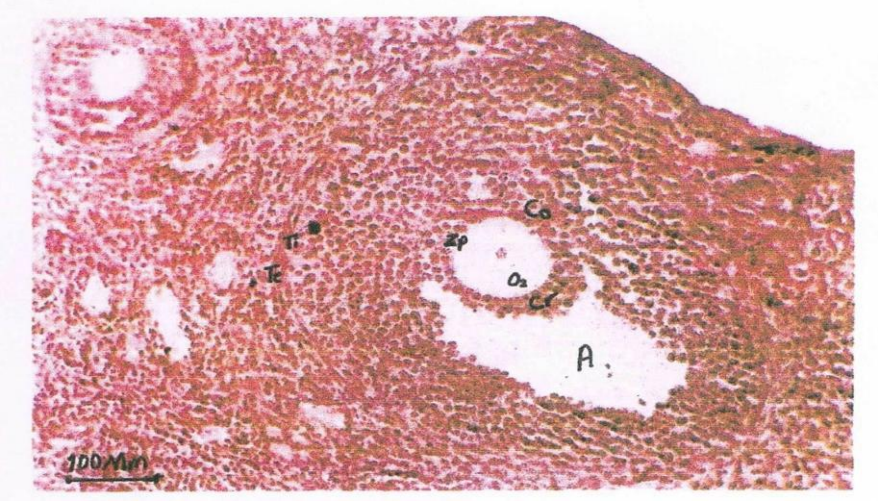
شكل (2) : مقطع في مبيض فأرة من مجموعة السيطرة يظهر فيه الجريبات الابتدائية (النجمة) والثانوية (السهم). صبغة الهيماتوكسلين– ايوسين– قوة التكبير 40×.



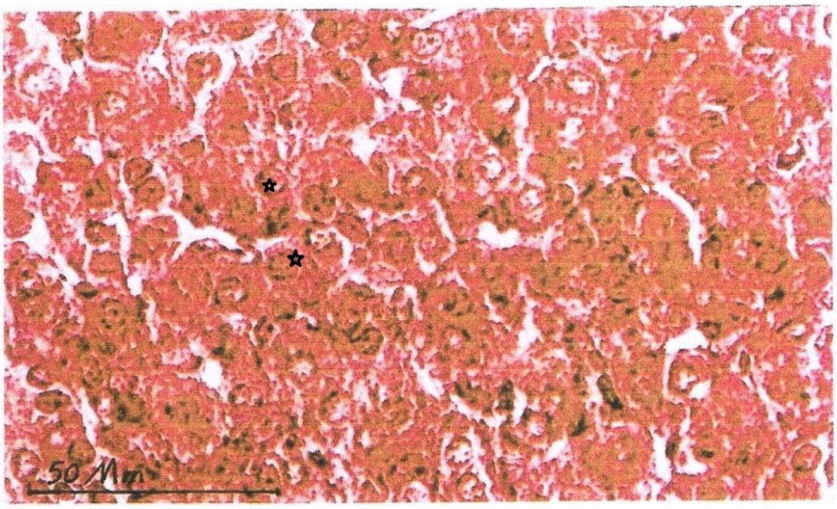
شكل (3): مقطع في مبيض فأرة من مجموعة المعاملة يظهر فيه تؤمه الجريبات المبيضية الناضجة (السهم). وجريبة مبيضية ناضجة مفردة (النجمة). والأوعية الدموية في اللب (M). صبغة الهيماتوكسلين– ايوسين– قوة التكبير ×100.



شكل (4) : مقطع في مبيض فأرة من مجموعة المعاملة يظهر فيه عملية الأباضة Ovulation في الجريبة المبيضية الناضجة (السهم). وجريبة ثانوية (النجمة). صبغة الهيماتوكسلين– ايوسين– قوة التكبير ×100.



شكل (5): مقطع في مبيض فأرة من مجموعة السيطرة يظهر فيه الجريبة المبيضية الثانوية والجريبة الناضجة فيها خلية البيضة الثانوية Secondary oocyte (O_2) والمنطقة الشفافة Zona pellucida(ZP) والركمة المبيضية Cumulus oophorus (Co) والتاج المتشعشع Corona radiate (Cr) والغار Antrum (A) والقراب الداخل Thecu interna (Ti) والقراب الخارجي Theca externa (Ti) صبغة ملوري الثلاثية (MTS) قوة التكبير 100×.



شكل (6): مقطع في مبيض فأرة من مجموعة المعاملة يظهر فيها الخلايا الوتينية (النجمة) في الجسم الأصفر صبغة ملوري الثلاثية (MTS) قوة التكبير 100×.

References

1. Bitto, A; Burnett, B. P. and Polito, F. (2008). Effects of genistein in ostwoporotic. Ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifen and oestradiol. British Journal of Pharmacology. 155(6): 896-950.

2. Daniel, W. W. (1983). Biostatics: A Foundation for Analysis In the Health. John Wiley and Sons, New York USA.

3. Gunther, D. F. and Diekema, D. S. (2006). Attenuating growth in children with profound developmental disability: Anew approach to an old dilemma. Arch Pediatr Adolesc Med. 160(10): 1013-1017.

4. Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2006). Textbook of Medical Physiology Philadelphia – London.

5. Harris-young, L. (1995). Principles of Hematology. Brown Publishers. Wmx. UK.

6. Kensil, C. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. Reviews in the therapeutic drug carrier systems. 13: 1-55.

7. Klien, K. O.; Muna, J. and Jeffery, A. (2008). Estrogen bioactivity in fo– ti and other herbs. Herds used for these estrogen like effect determined by a recombinant cell biology. J. Clinical Endocrinology and Metabolism. 5(15): 1-3.

8. Kurzer, M. and Xu, X. (1997). Dietary phytoestrogen. Ann Rev Nutr 17: 353-381.

9. Lee, G. and Luna, L. G. (1968). Manual of Histological Staining Method of Armed Forces Institutes of Pathology. 3rd ed., Mc Grow-Hill Book Company. New York. 12-31.

10. Lei, B.; Roncaglia, V.; Vigano, R.; Cremonini, C.; De. Maria, N.; Del-Buono, M. G.; Manenti, F. and villa, E. (2002). Phytoestrogens and liver disease. Mol. Cell. Endocrinol. 193(1-2): 81-84.

11. Menon, D. and Vongpatanasin, W. (2006). Effect of trance dermal estrogen replacement therapy on cardiovascular risk factors. Treat. Endocrinol. 5(1): 37-51.

12. Myers, R. L. (1995). Laboratory Manual of Immunology. 2nd ed., WMC, Brown Publisher USA.

13. Nikov, G. (2005). Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptor and the effect on estrogen receptor-response element complex formation. Environmental Health Prespectives. 108: 867-872.

14. Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T. and Yoshikawa, M. (2000). Adjuvant and hemolytic activities of 47 saponins derived from Medicinal and food plants. Biological Chemistry. 381: 64-74.

15. Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility corrected amino acid score. Journal of Nutrition. 130: 1860-1867.

16. Sowers, M. R. M.; Jannausch, D. and Connell, Mc. (2006). Hormone predictors of boon mineral density changes during the menopausal transition. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 91(4): 1261-1267.

17. Thompson, L; Boucher, B.; Liu Z.; Cotterchio, M. and Kreiger, N. (2006). Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans and coumestan. Nutrition Cancer. 54(2): 184-201.

18. Tilghman, S. L.; Boue, S. M. and Burow, M. E. (2011). Glyceollins, anovel class of ant estrogenic phytoalexins. Molecular and cellular pharmacology. Dol: 10,42 SS/Mc pharmacol. 10.21. Mol. Call. Pharmacol .2(4): 155-160.

19. Valester, L.; Kilkkinen, A. and Mazur, W. (2003). Phyto-oestrogen data base of food and average in Finland. Br. J. Nutr. 89: 1-31.

20. Zhang, E. J. (2007). Extraction and purification of isoflavones from soybean and the characterization of their estrogenic activities. J. Sci. and Techrology. 134(5): 817-823.