

Original Article

Effects of methanol extract of soy on the apoptosis of hippocampal cells in ovariectomized rats

Nasirzadeh MR^{1*}, Babapour V², Ahmadi-Asl N³, Roshangar L⁴, Nazemieh H⁵

1- Department of Physiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I. R. Iran.

2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I. R. Iran.

4- Department of Histology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I. R. Iran.

5- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I. R. Iran.

Received January 31, 2011; Accepted June 19, 2011

Abstract:

Background: The decline in estrogen level after menopause results in a decrease in life quality and different neurological disorders such as memory impairment. However, hormone replacement therapy remains controversial. Some studies have been investigated the effects of soy phytoestrogens (e.g. genistein) on cognitive brain functions. This study aimed to examine the effect of oral administration of soy extract on the apoptosis of hippocampus cells.

Materials and Methods: In this study, 30 rats were randomly allocated into 3 equal groups: 1) Sham (surgery without ovariectomy); 2) ovariectomized (OVX) and 3) treatment (OVX+soy extract). The animals in the treatment group received soy extract (60mg/kg) daily in drinking water by gavage for six weeks. At the end of treatment, brain samples of all animals were collected for tissue sectioning. Apoptosis in hippocampal cell was studied using the TUNEL method and a light microscopy.

Results: Oral administration of soy extract significantly decreased the number of apoptotic (neuronal and glial) cells ($P<0.05$), while ovariectomy significantly increased the number of apoptotic cells in the ovariectomized group compared to the Sham ($P=0.034$) and treatment groups ($P=0.016$).

Conclusion: Results of this study indicate that the oral administration of soy extract in ovariectomized rats had neuroprotective effects by decreasing the number of apoptotic cells.

Keywords: Soy extract, Ovariectomy, Apoptosis, Rat, Hippocampal cells

* Corresponding Author.

Email: mr.nasirzadeh@iaut.ac.ir

Tel: 0098 914 101 5108

Fax: 0098 411 637 3935

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences January, 2013; Vol. 16, No 6, Pages 501-506

Please cite this article as: Nasirzadeh MR, Babapour V, Ahmadi-Asl N, Roshangar L, Nazemieh H. Effects of methanol extract of soy on the apoptosis of hippocampal cells in ovariectomized rats. *Feyz* 2013; 16(6): 501-6.

تأثیر عصاره متابولی سویا بر آپوپتوزیس سلول‌های هیپوکامپ در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده

محمد رضا نصیرزاده^۱، وهاب باباپور^۲، ناصر احمدی اصل^۳، لیلا روشنگر^۴، حسین ناظمیه^۵

خلاصه:

سابقه و هدف: حذف هورمون استروژن در دوران یائسگی باعث کاهش کیفیت زندگی و بروز اختلالات متعدد نورولوژیک از جمله اختلال در حافظه می‌گردد. هنوز نسبت خطر به فایده استفاده از هورمون درمانی برای جلوگیری از عوارض دوران یائسگی قابل بحث است. برخی مطالعات اثرات فیتواستروژن‌های سویا از جمله جنیستین را بر روی فعالیت‌های ذهنی بررسی کرده‌اند. اما اثرات عصاره سویا بر روی آپوپتوزیس در هیپوکامپ بررسی نشده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه حیوانات در ۳ گروه ۱۰ تایی شم (ایجاد برش جراحی در تهیگاه و بستن آن)، اواریکتومی شده (برداشت تخدمان‌های هر دو طرف) و درمان (اوریکتومی+ دریافت عصاره سویا) به طور تصادفی گروه‌بندی شدند. حیوانات گروه درمان، عصاره سویا را روزانه به میزان 60 mg/kg به صورت محلول در آب و از طریق گاواز دریافت نمودند. در پایان ۶ هفته از نمونه‌های مغزی هر ۳ گروه مقاطع بافتی تهیه گردیده و با کیت تشخیصی تائل جهت ارزیابی آپوپتوزیس با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: تجویز خوراکی عصاره سویا در گروه درمان، تعداد سلول‌های آپوپتویک عصبی و غیر عصبی (گلیال) را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$). در حالی که اواریکتومی باعث افزایش تعداد سلول‌های آپوپتویک عصبی و غیر عصبی در گروه اواریکتومی شد و این اختلاف از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های درمان ($P = 0.16$) و شم ($P = 0.34$) معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که تجویز عصاره سویا به‌روش خوراکی قادر است تعداد سلول‌های آپوپتویک عصبی و غیر عصبی را در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده کاهش داده و اثرات محافظت عصبی را اعمال نماید.

واژگان کلیدی: عصاره سویا، اواریکتومی، آپوپتوزیس، موش صحرایی، سلول‌های هیپوکامپ

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، صفحات ۵۰۱-۵۰۶

مقدمه

استروژن از طریق مکانیسم‌های مختلف از قبیل ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، کاهش ورود کلیم القاء شده با گلوتامات از طریق کانال‌های کلسیمی و بیان ژن‌هایی که در تولید فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، فاکتور رشد عصبی و فاکتور نوروتروفیک سلول‌های گلیال نقش دارند، تحلیل نورونی را مهار کرده و از طریق مکانیسم‌های ذکر شده به‌ویژه در هیپوکامپ با ممانعت از آپوپتوز در آن، در حافظه و یادگیری نقش مثبتی ایفا می‌کند [۲، ۱]. در دوران یائسگی و با حذف استروژن، تشکیل پروتئین بتا آمیلوبیڈ و خطر بیماری‌های تحلیل برندۀ عصبی افزایش می‌یابد.

بیماری‌های تحلیل برندۀ عصبی از قبیل آلزایمر معمول‌ترین علت فراموشی در این دوران است. هورمون درمانی اثرات مفیدی در به تأخیر انداختن بیماری‌های تحلیل برندۀ عصبی دارد، اما تجویز طولانی مدت استروژن با عوارض جانبی از قبیل انواع سرطان‌ها همراه است [۴، ۳]. دانه سویا و مکمل‌های آن یک منبع غنی از فیتواستروژن‌ها می‌باشد. فیتواستروژن‌ها در ۲ گروه اصلی قرار دارند: فلاونوئیدها و غیر فلاونوئیدها که فیتواستروژن‌های مصرفی در غذای انسانی در گروه فلاونوئیدها قرار داشته و شامل ایزو فلاونونها به‌ویژه جنیستین (Genistein) و دایدزین (Daidzein) هستند [۵]. Jacob و همکاران دریافتند که کومسترون (نوعی فیتواستروژن) اعمال آنتی استروژنیک در مغز و هیپوفیز موش صحرایی داشته و این اعمال به‌وسیله گیرنده‌های آلفای استروژن انجام می‌پذیرد [۶]. Lee و Choi نیز نشان داده‌اند که تجویز مزمون جنیستین در دوزهای بالا باعث آپوپتوز و سمیت در مغز موش صحرایی می‌گردد [۷]. در مقابل مطالعات دیگری اثرات مفید فیتواستروژن‌ها را بر روی بقاء نورونی و محافظت عصبی نشان می‌دهند. بیان شده است که جنیستین همانند ۱۷-پتا استرادیول و ویژگی‌های ضد آپوپتوزی در

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه فیزیولوژی، تبریز

^۲ دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

^۳ دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۴ دانشیار، گروه بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۵ دانشیار، گروه فارماکوگنوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

* لشان نویسنده مسئول؛

تبریز، جاده تهران، سه راهی اهر، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

تلفن: ۰۹۱۴-۱۵۱۰-۸۰۰. دوzen@ipm.ac.ir

پست الکترونیک: mr.nasirzadeh@iaut.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۳/۲۹

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۴

مغزی تا رسیدن به ناحیه هیپوکامپ انجام گرفت. از مقاطع مغزی هر گروه، تعداد ۱۰ نمونه انتخاب شده و با استفاده از تکنیک تشخیصی تانل (TUNEL)، سلول‌های آپوپتویک در ناحیه هیپوکامپ مشخص شدند. مشخصه این کیت که ساخت شرکت Roche کشور آلمان می‌باشد، جستجوی مرگ سلولی با آپوپتوزیس با مشخص نمودن قطعات شکسته شده DNA در سلول‌های انفرادی بهوسیله میکروسکوپ نوری می‌باشد که روشی بسیار سریع، حساس و از روش‌های اختصاصی مطالعه سلول‌های آپوپتویک با استفاده از میکروسکوپ نوری است. اساس این آزمایش نشان دار کردن انتهای آزاد ۳-OH در DNA شکسته شده بوده و به تکنیک تانل مشهور است [۱۳]. سلول‌های آپوپتویک در نتیجه اجرای تکنیک تانل با رنگ قهوه‌ای از سلول‌های سالم متمایز می‌شوند. سلول‌های عصبی به لحاظ اندازه بزرگتر و وجود هستک مشخص از سلول‌های گلیال که اندازه کوچک‌تری داشته و فاقد هستک بودند، به راحتی قابل تشخیص بودند که در زیر میکروسکوپ نوری در محدوده هیپوکامپ به تفکیک شمارش گردیدند (شکل‌های شماره ۱ تا ۴). مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر میانگین تعداد سلول‌های آپوپتویک در هیپوکامپ به روش تجزیه واریانس یک‌طرفه و با پس آزمون Tukey صورت گرفت. در بررسی آماری نتایج $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

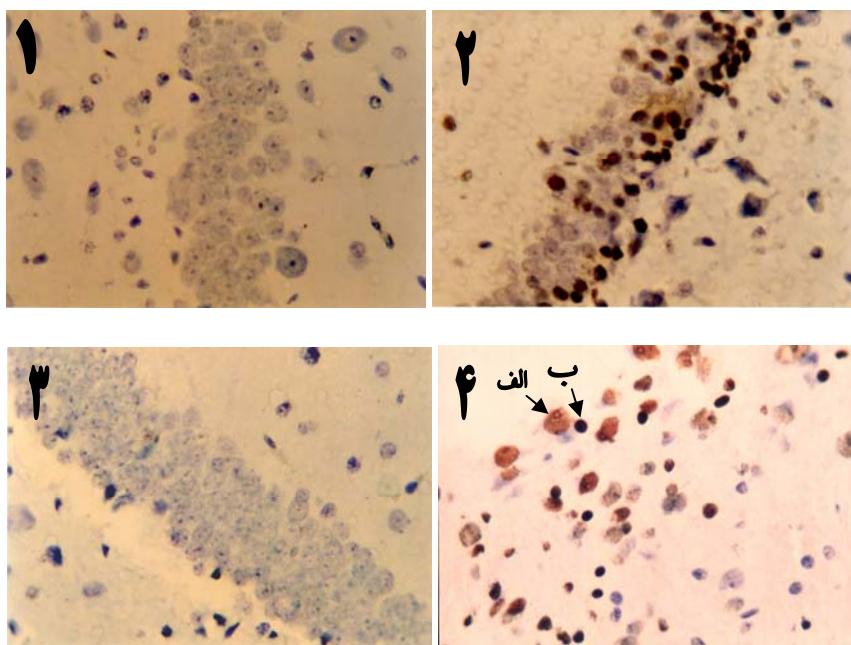
نتایج

بررسی آماری داده‌های به دست آمده از شمارش سلول‌های آپوپتویک هیپوکامپ نشان داد که تعداد نورون‌های آپوپتویک در گروه‌های شم و درمان نسبت به گروه اواریکتومی کمتر بود و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود (به ترتیب $P = 0.05$ و $P = 0.024$) (نمودار و جدول شماره ۱). هم‌چنین، تعداد سلول‌های گلیال آپوپتویک در گروه‌های شم و درمان نسبت به گروه اواریکتومی شده کمتر بود و اختلاف معنی داری بین گروه اواریکتومی با گروه‌های شم ($P = 0.041$) و درمان ($P = 0.021$) وجود داشت (نمودار و جدول شماره ۱). بررسی آماری گروه‌های مورد مطالعه از نظر شمارش کل سلول‌های آپوپتویک (اعم از عصبی و گلیال) نشان داد که در گروه‌های شم و درمان تعداد کل سلول‌های آپوپتویک نسبت به گروه اواریکتومی کمتر بود و این اختلاف نیز از نظر آماری معنی دار بود (به ترتیب $P = 0.034$ و $P = 0.016$) (نمودار و جدول شماره ۱).

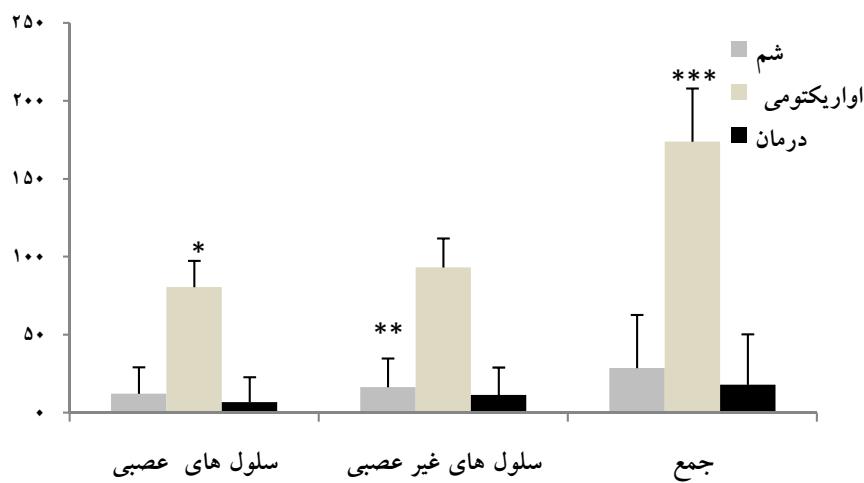
نورون‌های قشر مغز داشته و این اعمال از طریق گیرنده‌های استروژنی میانجی گری می‌شوند [۸]. هم‌چنین، مشخص شده است که فیتواستروژن‌های سویا محافظت کننده عصبی هستند [۹]. Perez-Martin صحرایی پیر هم قادر به افزایش تولید سلول‌های جدید در پاسخ به استرادیول و عصاره سویا هستند [۱۰]. اکثر مطالعات صورت گرفته اثرات ترکیبات مختلف مجود در سویا را به تنها ی و با دوزهای متفاوت بر روی آپوپتوزیس در نقاط مختلف سیستم عصبی مرکزی بررسی نموده‌اند، و این در حالی است که سویا با داشتن ترکیب این مواد با هم، که می‌توانند اثرات آنکوئیستی و یا آنکوئیستی داشته باشند، مورد استفاده عموم قرار دارد. لذا، با توجه به اهمیت هیپوکامپ در حافظه و استعداد آسیب‌پذیری آن با حذف هورمون استروژن، در مطالعه حاضر اثرات عصاره سویا بر روی میزان آپوپتوزیس سلول‌های هیپوکامپ در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن 250 ± 30 گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شده و به طور تصادفی در ۳ گروه به شرح زیر تقسیم شدند: (۱) گروه شم که در هر دو تهیگاه یک برش جراحی ایجاد و مجدداً بسته شد؛ (۲) گروه اواریکتومی و (۳) گروه درمان که حیوانات هر دو گروه مورد جراحی قرار گرفته و هر دو تخدمان خارج شدند [۱۱]. پس از ۲ هفته و بعد از بهبودی کامل حیوانات تجویز عصاره سویا آغاز گردید. حیوانات گروه درمان روزانه ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره سویا را از طریق گاواز و به صورت محلول در آب به مدت ۶ هفته دریافت نمودند. در گروه‌های شم و اواریکتومی نیز هم حجم عصاره، حلال عصاره (آب) گاواز می‌گردید [۱۰]. جهت تهیه عصاره متابولی سویا مقدار کافی از دانه‌های سویا آسیاب گردید و پودر حاصل ابتدا توسط هگزان چربی زدایی شده و سپس توسط متابول صد درصد عصاره گیری گردید. پس از تبخیر حلال توسط دستگاه روتاری اوپرатор تحت دما و فشار کم، باقیمانده عصاره به عنوان عصاره تام مورد استفاده قرار گرفت [۱۲]. در پایان دوره تجویز عصاره، مغز حیوانات پس از بیهودش کردن آنها خارج شده و نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند و سپس در پارافین قالب گیری گردیدند. در مرحله مقطع گیری، مقاطع متواالی از نمونه‌های



شکل ۱ تا ۴) نمای میکروسکوپی ناحیه هیپوکامپ در گروه‌های مورد مطالعه (بزرگ‌نمایی ۷۴۴ برابر). ۱) گروه شم (بافت طبیعی مغز); ۲) گروه اواریکتومی شده (فراآنی سلول‌های آپوپتوتیک در هیپوکامپ); ۳) گروه درمان (کاهش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در هیپوکامپ); و ۴) سلول‌های آپوپتوتیک که در نتیجه اجرای تکنیک تائل با رنگ قوههای مشخص شده‌اند. الف- سلول آپوپتوتیک عصبی و ب- سلول آپوپتوتیک غیرعصبی (گلیال)



نمودار شماره ۱- میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک شمارش شده در هیپوکامپ گروه‌های مورد مطالعه، مقادیر به صورت $\text{MEAN} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند ($P \leq 0.05$). *: تفاوت معنی دار با گروه‌های شم و درمان؛ **: تفاوت معنی دار با گروه‌های شم و درمان؛ و ***: تفاوت معنی دار با گروه‌های شم و درمان

جدول شماره ۱- میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک (نورون و غیر نورون) در گروه‌های مورد مطالعه

نام گروه	میانگین سلول‌های عصبی آپوپتوتیک	میانگین سلول‌های غیرعصبی آپوپتوتیک	مجموع
شم	$12/16\pm17/01$	$17/1644/44\pm18/54$	$28/66\pm34/14$
اوریکتومی	$80/55\pm17/01$	$93/22\pm18/54$	$173/77\pm34/14$
درمان	$6/7\pm16/137$	$11/4\pm17/09$	$18/1\pm32/38$
مقادیر P	سلول آپوپتوتیک غیر عصبی	سلول آپوپتوتیک عصبی	مجموع
شم- اواریکتومی	$0/05$	$0/41$	$0/034$
شم- درمان	$0/99$	1	$0/99$
درمان- اواریکتومی	$0/024$	$0/021$	$0/016$

بحث

[۱۸]. هم‌چنین، مشخص شده است که کومستروول در بیان BDNF در مغز اثراتی متضاد با استرادیول دارد [۶]. به علاوه، طی یک مطالعه نشان داده شده است که جنیستئین در دوزهای بالا به عنوان عامل القاء آپوپتوزیس عمل می‌نماید [۱۹]. Zhao و همکاران با آنالیز پتانسیل نوروتروفیکی جنیستئین و دایدزئین یعنی دو فیتواستروژنی که کاهش معنی داری در آزادسازی لاتکتات دهیدروژنаз (آنزیمی که در اثر آسیب غشاء پلاسمایی آزاد می‌شود) ایجاد می‌کنند، نشان دادند که هیچ‌یک از این دو مولکول، به تنهایی باعث اختلاف معنی دار در شاخص‌های مورفولوژیکی نورون‌های هیپوکامپی در شرایط برون تنی نمی‌شوند [۲۰]. سویا یک منبع غنی از فیتواستروژن‌ها می‌باشد که به سهولت در دسترس مردم قرار داشته و یک منبع غذایی به ویژه در جوامع شرقی محسوب می‌شود [۶]. اثرات بیولوژیکی مصرف خوارکی سویا بر سیستم عصبی خیلی کمتر مورد بررسی قرار گرفته و مکانیسم اثر ترکیبات فیتواستروژنیک هنوز ناشناخته مانده است [۱۶]. این احتمال وجود دارد که فارماکوکیتیک عصاره سویا در تجویز خوارکی با تزریقی آن متفاوت بوده و لذا اثرات بیولوژیکی متفاوتی ایجاد نماید [۳]. هم‌چنین، اکثر مطالعات صورت گرفته اثرات ترکیبات مختلف سویا را به تنهایی بررسی نموده‌اند، در حالی که در جوامع انسانی سویا به طور گستردۀ به عنوان یک جایگزین برای هورمون درمانی در زنان یائسه مصرف می‌شود [۲۱].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشخص گردید که سویا می‌تواند اثرات بسیار خوبی در جلوگیری از آپوپتوزیس در هیپوکامپ موش‌های صحرابی اواریکتونی شده داشته باشد. لذا، از این نظر شاید مصرف خوارکی سویا بتواند از بروز برخی از عوارض دوران یائسگی مثل اختلالات نورولوژیک جلوگیری نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه است. بدین‌وسیله از زحمات و راهنمایی‌های استاد ارجمند جناب آقای دکتر جعفر سلیمانی راد صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

نتایج به دست آمده از بررسی آپوپتوزیس در سلول‌های هیپوکامپ نشان داد که بین گروه‌های شم و درمان با گروه اواریکتونی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P < 0.05$). بنابراین عصاره سویا قادر بوده است مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را در سلول‌های هیپوکامپ کاهش دهد. به عبارت دیگر مطالعه حاضر نشان داد که عصاره سویا دارای قدرت محافظت عصبی از طریق کاهش آپوپتوزیس می‌باشد. وجود اختلاف معنی دار در میزان آپوپتوزیس بین دو گروه شم و اواریکتونی نشان داد که موافق با مطالعات دیگر، استروژن در محافظت عصبی و جلوگیری از آپوپتوزیس دارای نقش مثبت است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که استروژن از طریق مکانیسم‌های مختلف از قبیل افزایش فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، فاکتور رشد عصبی (NGF) و تنظیم بیان ژن Bcl-X در هیپوکامپ با کاهش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و جلوگیری از تحلیل نورونی، در حافظه و محافظت عصبی مؤثر بوده و بروز بیماری‌های تحلیل برنه عصبی از قبیل بیماری آنزایمر را به تعویق می‌اندازد [۱۵، ۱۴، ۲]. هم‌چنین، این مطالعه نشان داد که تعداد کل سلول‌های آپوپتوزیک در گروه درمان در مقایسه با گروه اواریکتونی کمتر بوده و این اختلاف از نظر آماری معنی داری بود که مؤید این مطلب است که عصاره سویا توانسته است اثراتی مشابه استروژن اعمال نموده و از آپوپتوزیس و تحلیل نورونی جلوگیری نماید. موافق با یافته‌های این مطالعه نشان داده شده است که فیتواستروژن‌های غذایی می‌توانند دانسیته زوائد در نورون‌های هرمی قشر پره فرونتال و ناحیه CA1 هیپوکامپ را افزایش دهند [۱۶]. هم‌چنین، نشان داده شده است که ایزوفلاؤن‌های سویا می‌توانند سنتز استیل کولین، تنظیم بیان ژن Bcl-2 (ژن مهارکننده آپوپتوز نورونی) و فاکتورهای نوروتروفیک از جمله BDNF و NGF را همانند استروژن در مغز موش‌های صحرابی ماده تحت تأثیر قرار دهند؛ به طوری که در موش‌های صحرابی دریافت کننده ایزوفلاؤن سویا سطوح RNA پیامبر BDNF در قشر فرونتال نسبت به موش‌های صحرابی اواریکتونی شده بالاتر است [۱۷، ۱]. Zeng و همکاران بیان نموده‌اند که تمامی موارد ایجاد شده به وسیله تیمار با بتا‌آمیلوئید ۳۵-۲۵ از جمله کاهش بقاء سلولی، قطعه قطعه شدن Caspas-3 و فعالیت DNA توسط جنیستئین معکوس می‌گردند.

References:

- [1] Anderson S. Nuclear receptor functions in the central nervous system: clues from Knockout mice.

Department of biosciences and nutrition Karolinska institute 2006;

Available at: <http://mend.endojournals.org/cgi/content/full/21/1/126>

- [2] Smith RG, Betancourt L, Sun Y. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev* 2004; 26(2): 203-250.
- [3] Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17(2): 253-71.
- [4] Henderson VW. Hormone therapy and Alzheimer's disease: benefit or harm? *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5(2): 389-406.
- [5] MacLusky NJ. Estrogen and Alzheimer's Disease: The Apo lipoprotein Connection. *Endocrinology* 2004; 145(7): 3062-4.
- [6] Jacob DA, Temple JL, Patisaul HB, Young LJ, Rissman EF. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor alpha. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226(4): 301-6.
- [7] Choi E, Lee BH. Evidence for genistein mediated cytotoxicity and apoptosis in rat brain. *Life Sci* 2004; 75(4): 499-509.
- [8] Linford NJ, Dorsa DM. 17beta - estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 2002; 67(13-14): 1029-40.
- [9] Azcoitia I, Moreno A, Carrero P, Palacios S, Garcia-Segura LM. Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in rat brain. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22(2): 63-9.
- [10] Perez-Martin M, Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, et al. Estradiol and soy extract increase the production of new cells in the dentate gyrus of old rats. *Exp Gerontol* 2005; 40(5): 450-3.
- [11] Varga H, Németh H, Tóth T, Kis Z, Farkas T, Toldi J. Weak if any effect of estrogen on spatial memory in rats. *Acta Biologica Szegediensis* 2002; 46 (1-2): 13 -6.
- [12] Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW. Soy bean ethanol extract increases the function of osteoblastic $MC_3T_3 - E_1$ cells. *Phytochemistry* 2001; 56(7): 733-39.
- [13] Liu Z, Gastard M, Verina T, Bora S, Mouton PR, Koliatsos VE. Estrogens modulate experimentally induced apoptosis of granule cells in the adult hippocampus. *J Comp Neurol* 2001; 441(1): 1-8.
- [14] Stoltzner SE, Berchtold NC, Cotman CW, Pike CJ. Estrogen regulates bcl-x expression in rat hippocampus. *Neuro Report* 2001; 12(13): 2797-800.
- [15] McEwen BS, Alves SE. Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocr Rev* 1999; 20(3): 279-307.
- [16] Luine V, Attalla S, Mohan G, Costa A, Frankfurt M. Dietary phytoestrogens enhance spatial memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized rats. *J Brain Res* 2006; 1126(1): 183- 7.
- [17] Hughes I, Woods H. Phytoestrogens and Health. The Food Standards Agency Committee on Toxicity 2003.
- Available at: http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/phytoreport_0503.pdf.
- [18] Zeng H, Chen Q, Zhao B. Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(2): 180-188.
- [19] Lee YB, Lee HJ, Sohn HS. Soy isoflavones and cognition function. *J Nutr Biochem* 2005; 16(11): 641- 49.
- [20] Zhao L, Chen Q, Diaz Brinton R. Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(7): 509-19.
- [21] Fournier LR, Ryan Borchers TA, Robison LM, Wiediger M, Park JS, Chew BP, et al. The effects of soy milk and isoflavones supplements on cognitive performance in healthy, postmenopausal women. *J Nutr Health Aging* 2007; 11(2): 155-64.