

## تأثیر کنجاله سویا در حفظ و نگهداری غضروف مفصل زانو در مدل حیوانی

زهرا طوطیان<sup>۱</sup> سیمین فاضلی پور<sup>۲\*</sup> محمد تقی شبیانی<sup>۱</sup> سید بابک کیایی<sup>۳</sup>

(۱) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه آناتومی، واحد پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران.

(۳) دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۴ تیر ماه ۱۳۹۰، پذیرش نهایی: ۱۰ آبان ماه ۱۳۹۰)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** سویا یکی از مهمترین منابع تأمین کننده پروتئین جیره غذایی است که می تواند موجب کاهش درد در مفاصل شود. **هدف:** با توجه به بروز بیماری های مفصلی و ایجاد آرتروز در مفاصل بدن، خصوصاً مفصل زانو، انجام مطالعه تأثیر سویا بر غضروف این مفصل ضروری است. **روش کار:** در این مطالعه ۳۶ سر موش سوری ماده نژاد Balb/c را در سن سه هفتگی انتخاب و بر اساس رژیم غذایی به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول، تحت رژیم کمبود پروتئین به مدت ۶ ماه، گروه دوم، سه ماهه اول کمبود پروتئین و سه ماهه دوم پروتئین کامل بدون سویا و گروه سوم، سه ماهه اول کمبود پروتئین و سه ماهه دوم پروتئین کامل حاوی ۲۰ درصد سویا قرار داده شدند. در پایان، میزان آلکالاین فسفاتاز (ALP) سرم خون تعیین و مقاطع رنگ آمیزی شده غضروف تیبیا مورد ارزیابی هیستومورفومتری قرار گرفتند. **نتایج:** ضخامت بخش میانی غضروف تیبیا و تعداد کندروسیت ها ( $12/77 \pm 1/57$  و  $14/84 \pm 1/05$ )، در گروهی که سویا مصرف کرده بودند نسبت به سایر گروه ها اختلاف معنی داری را نشان داد ( $p < 0/001$ ). همچنین میزان ALP سرم خون ( $204/67$  U/L) و غلظت ماده بین سلولی در گروه سوم نسبت به گروه های اول و دوم اختلاف معنی داری نداشت. **نتیجه گیری نهایی:** بطور کلی چنین نتیجه گیری می شود که شاید سویا بتواند بر رشد غضروف مفصل زانو تأثیر گذاشته و در حفظ و نگهداری غضروف مفصل زانوی افرادی که از کودکی با فقر پروتئینی همراه هستند مؤثر واقع شود.

واژه های کلیدی: کنجاله، غضروف، مفصل، موش.

### مواد و روش کار

۱- حیوانات: جهت انجام این مطالعه تعداد ۳۶ سر موش سوری ماده

سالم نژاد Balb/c را در سن سه هفتگی (به وزن ۱۲-۱۰ گرم) از سرم سازی حصارک تهیه و به آزمایشگاه بخش تشریح منتقل گردیدند. شرایط زندگی حیوانات ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب و دما ۲۲ درجه سانتیگراد بود. موش ها به مدت یک هفته جهت عادت کردن به محیط نگهداری شدند.

۲- جیره غذایی: ابتدا سه نوع جیره غذایی به شرح زیر تهیه گردید.

الف) جیره غذایی ۱: جیره غذایی با کمبود پروتئین (۱۳ درصد پروتئین).

ب) جیره غذایی ۲: جیره غذایی با پروتئین کامل (۲۳ درصد پروتئین).

ج) جیره غذایی ۳: جیره غذایی با پروتئین کامل (۲۳ درصد پروتئین) که ۲۰ درصد آن از کنجاله سویا تشکیل شده است.

۳- طبقه بندی گروه های آزمایش: حیوانات به سه گروه ۱۲ تایی بشرح ذیل تقسیم شدند.

گروه اول: از سن سه هفتگی به مدت ۶ ماه از جیره غذایی یک استفاده کردند.

گروه دوم: از سن سه هفتگی به مدت سه ماه از جیره غذایی یک و سه ماه دوم از جیره غذایی ۲ استفاده کردند.

گروه سوم: از سن سه هفتگی به مدت سه ماه از جیره غذایی یک و سه

### مقدمه

کنجاله سویا یکی از مهمترین و عمده ترین منابع تأمین کننده پروتئین گیاهی جیره غذایی است. یکی از خواص سویا کاهش درد و تورم مفاصل می باشد. در این رابطه محققین مطالعاتی بر روی اثر سویا بر مفاصل آسیب دیده در آستئوآرتریت انجام داده و توانستند علائم بهبودی بیماری را در آنها مشاهده نمایند (۱).

در مطالعه دیگری نشان داده شده است که پس از برداشتن منیسک مفصل زانوی حیواناتی که آواکادو و سویای غیرصابونی مصرف کرده بودند ضخامت غضروف غیرکلسیفیه در مفصل آنها مشاهده گردید (۳). بعلاوه آواکادو و سویای غیرصابونی نیز می تواند از تخریب غضروف جلوگیری کرده و موجب ترمیم آن شود و با تحریک سلول های غضروفی سبب سنتز کلاژن گردد (۵). این ماده نیز می تواند موجب فعالیت کلاژنولیتیک سلول های غضروفی در خرگوش شود (۷). محققین دیگر نشان داده اند که سویا می تواند موجب افزایش آلکالاین فسفاتاز (ALP) در سرم خون گردد (۱۰). با توجه به مطالعات انجام شده، حفظ و نگهداری غضروف مفصل زانوی افرادی که تا سن بلوغ دچار فقر پروتئین بوده اند و پس از آن از رژیم سویا استفاده کرده اند قابل توجه خواهد بود.



## نتایج

۱- ضخامت بخش میانی و لبه جانبی غضروف: ارزیابی داده‌های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه از نظر ضخامت بخش میانی و لبه جانبی غضروف، بین گروهی که به مدت ۶ ماه از غذای ۱ استفاده نموده با گروهی که سه ماهه اول از غذای ۱ و سه ماهه دوم از غذای ۲ استفاده کردند اختلاف معنی داری نبود. ولی ضخامت بخش میانی غضروف در مقایسه بین گروهی که به مدت ۶ ماه از غذای ۱ با گروهی که سه ماهه اول از غذای ۱ و سه ماهه دوم از غذای ۳ استفاده کردند تفاوت معنی داری را نشان داد ( $p < 0.001$ ) (جدول ۱).

۲- تعداد کندروسیت‌های بخش میانی غضروف تیبیا: نتایج آماری حاصل از مقایسه تعداد کندروسیت‌های بخش میانی غضروف تیبیا در گروهی غذای ۱ به مدت ۶ ماه مصرف کردند با گروهی که سه ماه اول از غذای ۱ و سه ماه دوم از غذای ۲ استفاده نمودند تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. در صورتیکه در مقایسه بین گروه‌هایی که به مدت ۶ ماه غذای ۱ مصرف کردند با گروهی که سه ماه اول از غذای ۱ و سه ماه دوم از غذای ۳ استفاده کردند اختلاف معنی داری بود ( $p < 0.001$ ) (جدول ۱).

۳- غلظت ماده بین سلولی بخش میانی غضروف تیبیا: نتایج حاصل از مطالعه غلظت ماده بین سلولی بخش میانی غضروف تیبیا، نشان داد که در مقایسه سه گروه آزمایشی، گروهی که سه ماه اول از غذای ۱ و سه ماه دوم از غذای ۳ استفاده کردند، نسبت به دو گروه دیگر، برتری دارد.

۴- ALP: نتایج آماری نشان داد که گروهی که سه ماهه اول از غذای ۱ و سه ماه دوم از غذای ۳ استفاده کردند ( $204/67$  U/L) از نظر میزان ALP سرم خون نسبت به دو گروه دیگر یعنی گروهی که سه ماه اول غذای ۱ و سه ماه دوم غذای ۲ ( $183/50$  U/L) و گروهی که شش ماه غذای ۱ ( $157/70$  U/L) برتری دارد.

## بحث

بروز مشکلات مفصلی و سائیدگی مفاصل در سنین بالا، تحقیقات اخیر را به سمت بررسی تأثیر موادی که بتوانند در حفظ و نگهداری غضروف مفصلی خصوصاً مفصل زانو که غضروف آن بیشتر دچار فرسایش می‌شود سوق داده است. در این میان محققین نشان داده‌اند که که مواد غذایی و داورهای حاوی گلیکوز آمینوگلیکان، می‌توانند بر رشد غضروف اثر بگذارند (۳). مطالعات دیگری نیز در زمینه اثر سویا بر مفاصل آسیب دیده انجام گرفته و علائم بهبودی در آنها گزارش شده است (۱).

در گذشته مطالعاتی که بر روی غضروف مفصلی انجام می‌گرفت تنها به نتایج هیستولوژی یک از نظر کیفی اکتفا می‌شد ولی امروزه با استفاده از آنالیز تصاویر کامپیوتری و مطالعه هیستومورفومتریک بررسی کمی و کیفی امکان پذیر گردیده است (۵، ۱۱). در مطالعه حاضر نیز روشی مشابه بکار برده شده است. محققین افزایش ضخامت غضروف را در طبق تیبیا

ماه دوم را از جیره غذایی ۳ استفاده کردند.

۴- تهیه نمونه‌های خونی: در پایان دوره آزمایش ابتدا موش‌ها را با کلروفرم بیهوش نموده و سپس به کمک سرنگ ۲ سی سی از بطن چپ آنها مستقیماً خونگیری کرده و سرم خون حیوانات را به کمک سانتریفوژ جدا نموده و در دمای ۷۰- درجه نگهداری گردید. جهت تعیین میزان ALP سرم خون، نمونه‌ها به آزمایشگاه ارسال گردیدند.

۵- تهیه نمونه‌های بافتی: جهت تهیه نمونه‌های بافتی از غضروف مفصل زانو ابتدا پوست و عضلات زانوی اندام عقبی چپ حیوانات را جدا کرده سپس مفصل زانو خارج و جهت فیکساسیون در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند و پس از دکلسیفیه کردن نمونه‌ها (۳) به انجام مراحل آماده‌سازی بافتی اقدام گردید. لازم به ذکر است که انجام برش‌های بافتی به صورت مقاطع سهمی از بخش خارج به داخل طبق استخوان تیبیا به ضخامت ۵ میکرومتر بود. رنگ آمیزی مقاطع با دو روش هماتوکسیلین-انوزین و تولدئیدین بلو صورت گرفت. از هماتوکسیلین-انوزین به منظور تعیین ضخامت بخش میانی غضروف تیبیا و لبه جانبی آن و شمارش تعداد کندروسیت‌ها و از تولدئیدین بلو جهت تعیین غلظت ماده بین سلولی استفاده گردید.

۶- ارزیابی هیستومورفومتریک به کمک تجزیه و تحلیل تصاویر کامپیوتری: ابتدا از لام‌های رنگ آمیزی شده توسط فتومیکروسکوپ عکس برداری و سپس تصاویر بدست آمده به کمک کامپیوتر مجهز به نرم افزار مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت. جهت تعیین ضخامت بخش میانی و لبه جانبی غضروف طبق تیبیا ابتدا در تمام تصاویر بخش‌های مورد نیاز مشخص گردیده و سپس ضخامت آن بر حسب میکرومتر تعیین و ثبت گردید. کندروسیت‌ها نیز در بخش میانی غضروف تیبیا در سطحی به اندازه  $25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  شمارش شدند. در بررسی تعیین غلظت ماده بین سلولی از نمونه‌هایی که به روش تولدئیدین بلورنگ آمیزی شده بود استفاده گردید به طوری که شدت رنگ آبی به ترتیب، + در نمونه‌های کم‌رنگ، ++ در نمونه‌های رنگ متوسط و +++ در نمونه‌های پررنگ، که نشان دهنده غلظت ماده بین سلولی بود، از مینیمم مقدار تا ماگزیمم آن مشخص و ثبت گردید.

۷- تجزیه و تحلیل آماری: ارزیابی داده‌های بدست آمده مربوط به ضخامت بخش میانی غضروف تیبیا و لبه جانبی آن و تعداد کندروسیت‌ها از آزمون Independent samples، جهت تعیین شدت غلظت ماده بین سلولی از آزمون Kruskal-Vallis و میزان ALP سرم خون از طریق آزمون ANOVA (آنالیز واریانس یک طرفه) استفاده گردید.

جهت مقایسه گروه‌هایی که از رژیم غذایی یک به مدت ۶ ماه استفاده کردند با گروهی که در این مدت تحت دو نوع رژیم غذایی (در دو دوره سه ماهه) بودند از روش Independent samples استفاده شد.



جدول ۱- مقایسه ضخامت بخش میانی و لبه جانبی غضروف تیبیا و تعداد سلول در بخش میانی غضروف تیبیا در گروهی که شش ماه غذای یک مصرف کرده اند با دو گروه ترکیبی (۱- سه ماه اول غذای یک، سه ماه دوم غذای دو. ۲- سه ماه اول غذای یک، سه ماه دوم غذای سه). حروف ناهماهنگ دال بر اختلاف معنی دار می باشد. SEM: Standard error of mean. ( $p < 0.001$ ).

شاخص	گروه‌ها	شش ماه اول غذای یک	سه ماه اول غذای یک، سه ماه دوم غذای دو	سه ماه اول غذای یک، سه ماه دوم غذای سه
ضخامت بخش میانی غضروف تیبیا ( $\mu\text{m}$ )		۱۰۰/۱۲±۳/۲۵ <sup>a</sup>	۱۰۳/۲۴±۱۷/۴۶ <sup>ab</sup>	۱۴۸/۸۴±۱۴/۰۵ <sup>b</sup>
لبه جانبی غضروف تیبیا ( $\mu\text{m}$ )		۶۱/۳۰±۹۴ <sup>a</sup>	۸۳/۳۴±۱۴/۱۱ <sup>a</sup>	۱۰۶/۰±۱۴/۵۲ <sup>a</sup>
تعداد سلول ( $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )		۷/۵۰±۱/۴۱ <sup>a</sup>	۱۱/۱۶±۱/۱۷ <sup>ab</sup>	۱۲/۷۷±۱/۵۷ <sup>b</sup>

گرددید که میزان ALP سرم خون موش هائی که بعد از سه ماه مصرف از غذای با کمبود پروتئین، از غذای حاوی کنجاله سویا استفاده کردند افزایش یافته است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که شاید در افرادی که از کودکی تا بلوغ با کمبود پروتئین مواجه هستند، امکان وجود اختلال در مفاصل آن‌ها را، بوسیله مصرف کنجاله سویا در جیره غذایی تا حدودی کاهش داده و موجب حفظ و نگهداری بیشتری در غضروف مفصل زانوی آنها گردد.

### تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران که در تأمین بودجه این طرح همکاری نمودند.

### References

1. Blotman, F., Maheu, E., Wulwik, A., Caspard, H., Lopez, A. (1997) Efficacy and safety of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the knee and hip. A prospective, multicenter, three-month, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Rev. Rhum.* 64:825-34.
2. Boumediene, K., Felisaz, N., Bogdanowicz, P., Galera, P., Guillou, G. B., Pujol, J. P. (1999) Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 42:148-56.
3. Cake, M. A., Read, R. A., Guillou B., Ghosh P. (2000) Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU). *Osteoarthr. Cartil.* 8:404-411.
4. Dykgraaf, S., Firth, E. C., Christopher W. Rogers, C.

پس از برداشتن منیسک مفصل زانوی گاو در اثر مصرف آواکادو و سویای غیرصابونی مشاهده نمودند (۳). در این مطالعه هم افزایش معنی داری در ضخامت بخش میانی غضروف طبق تیبیا در گروهی که ۳ ماهه اول از غذای (کمبود پروتئین) و سه ماهه دوم از غذای ۳ (پروتئین کاملی که ۲۰ درصد آن از کنجاله سویا تشکیل شده است) مصرف کرده بودند نسبت به گروهی که به مدت ۶ ماه از غذای (کمبود پروتئین) استفاده کردند مشاهده گردید. در صورتیکه در این تحقیق نشان داده شد، موش هائی که در سه ماهه اول از غذای (کمبود پروتئین) او در سه ماه دوم از غذای ۲ (پروتئین کامل بدون سویا) استفاده کرده اند نسبت به گروهی که ۶ ماهه از غذای (کمبود پروتئین) مصرف کرده بودند نتوانسته است افزایش معنی داری را در ضخامت غضروف ایجاد نماید. این نتایج می تواند بیانگر تأثیر سویا به عنوان یک ماده حافظ غضروف باشد.

مطالعات دیگری در زمینه اثر ورزش بر روی کندروسیت ها انجام شده و نشان داده است که ورزش می تواند موجب زنده ماندن این سلول ها شود (۴). مطالعه حاضر نشان داد که کنجاله سویا نیز می تواند موجب افزایش معنی دار کندروسیت ها در موش هائی که تا سه ماه از غذای یعنی با کمبود پروتئین مواجه بودند، شود. محققین دیگر گزارش نمودند که آواکادو و سویا می توانند موجب ایجاد شدت رنگ آبی را در رنگ آمیزی تولدئیدین بلور در بخش میانی غضروف تیبیا شده و برتری خود را نسبت به گروهی که از این مواد استفاده نکرده بودند نشان دهد. این محققین بیان نمودند که شدت رنگ آبی در غضروف تیبیا می تواند به دلیل افزایش پروتئوگلیکان باشد که ممکن است با کاهش کاتابولیسیم و یا افزایش آنابولیسیم همراه باشد. چنانچه گذشتگان نیز پیشنهاد نمودند که مهمترین عمل آواکادو و سویا ممکن است افزایش بیان  $\beta$  growth factor Transforming ( $\text{TGF}\beta$ ) باشد که موجب تحریک تولید ماده بین سلولی توسط کندروسیت ها شده است (۲). به علاوه  $\text{TGF}\beta^2$  می تواند موجب تحریک کندروسیت ها برای تولید کلاژن و گلیکوز آمینوگلیکان در غضروف خرگوش شود (۹).

مطالعه دیگری بیانگر افزایش ALP در سرم خون متعاقب مصرف مکمل های گیاهی مانند سویا بوده است (۱۰) همچنین در این رابطه نشان داده شده میزان ALP در ماده بین سلولی ناحیه هیپرتروفی صفحه رشد استخوان تیبیا افزایش یافته است (۸). در مطالعه حاضر نیز مشخص



- W., Kawcak, C. E. (2008) Effects of exercise on chondrocyte viability and subchondral bone sclerosis in the distal third metacarpal and metatarsal bones of young horses. *Vet. J.* 178: 53-61.
5. Henrotin, Y. E., Labasse, A. H., Jaspar, J. M., De Groote, D. D., Zheng, S. X., Guillou, G. B. et. al. (1998) Effects of three avocado/ soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes. *Clin. Rheumatol.* 17:31-9.
6. Leroux, M. A., Cheung, H. S, Bau, J. L., Wang, J. Y., Howell, D. S., Setton, L. A. (2001) Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthr. Cartil.* 9: 633-40.
7. Mauviel, A., Loyau, G., Pujol, J.P. (1991) Effect of unsaponifiable extracts of avocado and soybean (Piascledine) on the collagenolytic action of cultures of human rheumatoid synoviocytes and rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* 58:241-5.
8. Miao, D., Scutt, A. (2002) Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 333-340.
9. Redini, F., Galera, P., Mauviel, A., Loyau Pujol, J. P. (1988) Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* 234: 172-176.
10. Shigemoto, G., Rossi, E., Baldissera, V., Gouveia, C., de Valdez Vargas, G., de Andrade Perez S. (2007) Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas.* 57:261-70.
11. Shimizu, C., Coutts R. D., Healey, R. M., Kubo, T., Hirasawa, Y., Amiel, D. (2008) Method of histomorphometric assessment of glycosaminoglycans in articular cartilage. *J. Orthopaed Res.* 15: 670 - 674.



## The effect of soybean meal on the maintenance of cartilage in animal knee joints

Tootian, Z.<sup>1</sup>, Fazelipour, S.<sup>2\*</sup>, Sheibani, M.T.<sup>1</sup>, Kiaei, S.B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran.

<sup>3</sup>School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran-Iran.

(Received 5 July 2011 , Accepted 1 November 2011)

---

### Abstract:

**BACKGROUNDS:** The soybean is one of the most important diet protein resources and induces a reduction of joint pain. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to determine the incidence of joint disorders and arthritis, especially in the knee joint. **METHODS:** According to the feed regimens, 36 female mice (balb/c; 3 weeks old) were divided into 3 groups including Group 1: Low protein for 6 months; Group 2: Low protein for 3 months and then followed by complete (or full) protein without soybean meal for the next 3 months and Group 3: Low protein for the first 3 months and then followed by complete protein with 20% soybean meal for the next 3 months. Finally the serum alkaline phosphatase (ALP) was measured and sections from the tibial cartilage were histomorphometrically studied. **RESULTS:** The thickness of the middle part of the tibial cartilage and the number of chondrocytes in the group used soybean meal ( $148.84 \pm 14.05, 12.77 \pm 1.57$ , respectively) showed a significant difference compared with the other groups ( $p < 0.001$ ). Meanwhile, serum ALP levels (76.402L/U) and the concentrations of the inter-cellular substance in the 3th group showed no significant difference compared with the other groups. **CONCLUSIONS:** It is concluded that soybean may effect on the growth of the knee joint cartilage in animals and also may induce stability of the knee joint cartilage in individuals with protein deficiency since childhood.

**Key words:** soy-bean meal, cartilage, knee joint, alkaline phosphalase.

\*Corresponding author's email: [simin\\_fazelipour@yahoo.com](mailto:simin_fazelipour@yahoo.com), Tel: 021-22006661, Fax: 021-22600714

