

تأثیر جنیستین (Genistein) بر هورمونهای جنسی، تعداد و قابلیت زنده ماندن اسپرم در موش های صحرایی نر بالغ

رستم قربانی (PhD)^۱، صدیقه قنبری (MSc)^۲، مظفر خزاعی (PhD)^۱، سیروس جلیلی (PhD)^{۳*}

۱- مرکز تحقیقات باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۳- گروه آناتومی و بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

دریافت: ۸۹/۹/۲۰، اصلاح: ۸۹/۱۱/۲۰، پذیرش: ۹۰/۲/۷

خلاصه

سابقه و هدف: جنیستین یک فیتواستروژن موجود در سویا است که دارای اثرات استروژنیک می باشد. فیتواستروژن بعنوان یکی از عوامل ناباروری در برخی حیوانات معرفی شده اما مطالعات مرتبط با اثر جنیستین بر سیستم تولید مثل مذکر نتایج متناقضی را به همراه داشته است. لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر جنیستین بر اسپرماتوژنز در موش صحرایی انجام شد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی به ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده سنی ۱۳ هفته (۲۲۰-۲۵۰ گرم) در پنج گروه پنج تایی دوزهای مختلف جنیستین (۴ و ۲ و ۱ و ۰/۵ و صفر میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی در ۱۴ روز متوالی تجویز شد. پس از ۲۴ ساعت حیوانات کشته شده و سطح پلاسمایی هورمون های تستوسترون، (Follicle Stimulating Hoemone, FSH) و (Luteinizing Hormone, LH) به روش ELAISA و همچنین پارامترهای اسپرم طبق روش سازمان جهانی بهداشت اندازه گیری شد.

یافته ها: تجویز جنیستین در دوزهای پایین باعث کاهش معنی دار سطح پلاسمایی FSH شد، در صورتیکه با افزایش دوز این اثر مهاری کاهش تدریجی داشته و به طور وابسته به دوز به سطح گروه شاهد افزایش یافت ($p < 0/05$). از طرف دیگر جنیستین تأثیر معنی داری بر سایر شاخصه ها نداشت.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده ممکن است جنیستین با تأثیر بر سطح پلاسمایی FSH بر عملکرد سیستم تناسلی مذکر موثر باشد.

واژه های کلیدی: جنیستین، فیتواستروژن، تستوسترون، شمارش اسپرم، موش صحرایی.

مقدمه

نقش آن در پیشگیری از بیماریهای قلبی و عروقی (۸)، کنترل قند خون در بیماران دیابتی (۹) و کاهش علائم سندرم یائسگی از سوی دیگر موجب گردیده که مصرف ترکیبات غذایی حاوی سویا به اشکال مختلف (آرد، شیر، مکمل های غذایی، غذای کودک و...) در رژیم غذایی افراد جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص دهد (۱۰). مطالعات صورت گرفته نشان داده اند که تعداد اسپرم اپیدیدیم، اندازه بیضه و سطح تستوسترون پلاسمای موش های صحرایی که در دوران نئوناتال در معرض ترکیبات شیمیایی استروژنی قرار گرفته اند، کاهش یافته و نظم بیان ژن های بیضی آنها پایین بوده است (۱۴-۱۱). علاوه بر این، تجویز

جنیستین (Genistein) فیتواستروژنی است که در بعضی از گیاهان خوراکی و حبوبات مخصوصاً "دانه سویا" یافت می شود. فیتواستروژنها ترکیبات غیراستروئیدی با فعالیت شبه استروژنی می باشند (۴-۱). در حدود ۹۹٪ جنیستین در دانه سویا به صورت ترکیب با ملکول قند یافت می شود. و قتیکه دانه سویا یا ترکیبات دیگر حاوی جنیستین مصرف می شوند، این ترکیب تحت تأثیر باکتریها و آنزیم های روده شکسته شده، ملکول قند آزاد گردیده و جنیستین جذب می شود (۱). امروزه با توجه به نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد نقش سویا در جلوگیری از بروز سرطان های سینه (۵)، پروستات (۶) و کولون (۷) از سوئی و

این مقاله حاصل پایان نامه صدیقه قنبری دانشجوی کارشناسی ارشد آناتومی و طرح تحقیقاتی به شماره ۸۸۰۶۱ دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می باشد.

* مسئول مقاله:

e-mail: cjalili@kums.ac.ir

آدرس: کرمانشاه، سرخه لیژه، خیابان پرستار، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۴۶۱۸-۲۰

روش اجرای آزمایش و تعیین دوز و زمان تزریق: کلیه تزریقات با حجم

نهایی یک میلی لیتر بر کیلوگرم و به صورت زیر جلدی هر روز و به مدت ۲ هفته و رأس ساعت ۱۲ ظهر صورت گرفت. موشها به پنج گروه پنج تایی تقسیم شدند. حیوانات گروه شاهد تحت تجویز حلال (۰/۳۴ میلی لیتر الکل مطلق به همراه ۰/۶۶ میلی لیتر روغن ذرت استریل) قرار گرفتند (۲۴ و ۲۵). پنج گروه دیگر حیوانات تحت تجویز زیر جلدی جنیستین (۴ و ۲ و ۱ و ۰/۵ و ۰) محلول در حلال فوق الذکر و با حجم نهایی یک میلی لیتر بر کیلوگرم قرار گرفتند (۲۶ و ۲۷). انتخاب این دوزها در محدوده دوزهای احتمالی است که انسان ممکن است در معرض ترکیبات فیتواستروژنی قرار بگیرد (۱۹). موشها بیست و چهار ساعت پس از آخرین تزریق با کلروفرم تحت بیهوشی عمیق تا ایجاد مرگ قرار گرفتند. سپس بلافاصله از طریق بطن، خون گیری جهت آزمایشهای هورمونی صورت گرفت.

تعیین پارامترهای اسپرم: تعیین تعداد اسپرم برحسب میلیون در هر میلی لیتر از مایع منی و همچنین قابلیت زنده ماندن (viability) آنها برحسب درصد طبق پروتکل سازمان جهانی بهداشت انجام گردید. بدین منظور در تمامی نمونه ها، پس از جدا سازی اپیدیدیم از بیضه (به کمک استریو میکروسکپ)، از بخش انتهایی دم تا محل جدا شدن وازدفران نمونه گیری شد.

تعیین سطح سرمی هورمون ها: بعد از بیهوشی عمیق، مقدار ۵ سی سی نمونه خون از بطن چپ گرفته شد و با روش ELISA و توسط کیت های اختصاصی (Monobind ساخت شرکت Accubind کشور آمریکا و Immunotech ساخت شرکت Becton coulter جمهوری چک) سطح سرمی هورمون های تستوسترون برحسب نانوگرم در میلی لیتر، LH و FSH برحسب واحد بین المللی در لیتر تعیین گردید.

اطلاعات با استفاده از از آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

پارامترهای اسپرم: نتایج نشان داد که تجویز دوز پایین جنیستین باعث افزایش تعداد اسپرم شده اما دوزهای بالای آن بر روی این شاخصه تاثیر چندانی ندارد (به ترتیب $4/9 \pm 14/23$ و $3/87 \pm 12/35$ و $4/06 \pm 24/04$ و $4/73 \pm 29/22$ و $2/57 \pm 16/44$ برای دوزهای ۴ و ۲ و ۱ و ۰/۵ و (صفر) و تفاوت مذکور از لحاظ آماری معنی دار نیست ($p > 0.05$, $F(4,20) = 2/65$) (جدول ۱). در پارامتر قابلیت زنده ماندن اسپرمها نیز بین گروههای مورد مطالعه تفاوت معنی داری مشاهده نشد (به ترتیب $74 \pm 18/5$ و $95 \pm 0/96$ و $92/22 \pm 0/52$ و $93/4 \pm 0/81$ و $94/7 \pm 0/9$ برای دوزهای ۴ و ۲ و ۱ و ۰/۵ و (صفر) (جدول ۱).

هورمون های جنسی: نتایج نشان داد که تجویز دوزهای 4 mg/kg و 2 mg/kg جنیستین باعث کاهش سطح پلاسمایی تستوسترون شد اما تجویز دوز 4 mg/kg دارو مجدداً سطح پلاسمایی تستوسترون را افزایش داد (به ترتیب $3/52 \pm 1/79$ و $3/48 \pm 1/48$ و $5/36 \pm 0/62$ و $2/96 \pm 0/09$ و $2/8 \pm 1/09$ و $4/78 \pm 0/8$ برای دوزهای ۴ و ۲ و ۱ و ۰/۵ و (صفر)، اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی دار نبود ($p > 0.05$, $F(4,20) = 0/75$) (جدول ۱). نتایج نشان داد که بطور کلی غلظت پلاسمایی هورمون FSH در گروه های مختلف با

مقادیر زیاد جنیستین بر تولید هورمونهای غده آدرنال و بیضه درموش های صحرایی موثر است (۱۵). از طرفی وجود ارتباط بین مصرف سویا و کاهش تعداد و تحرک اسپرم نشان داده شده است (۱۶ و ۱۷). علیرغم بیان ارتباط بین تماس با جنیستین و اختلال در سیستم تولید مثل مذکر در مطالعات ذکر شده، مطالعات دیگری نیز نشان می دهد که تماس با جنیستین تأثیر آشکار و قابل توجهی در فرآیند گامتوژن (۱۸)، کیفیت اسپرم و یا تغییر در بیان ژن بیضوی (۱۹) و لوله تولید مثلی (۲۰) و کیفیت مایع سمن (۲۱) ندارد.

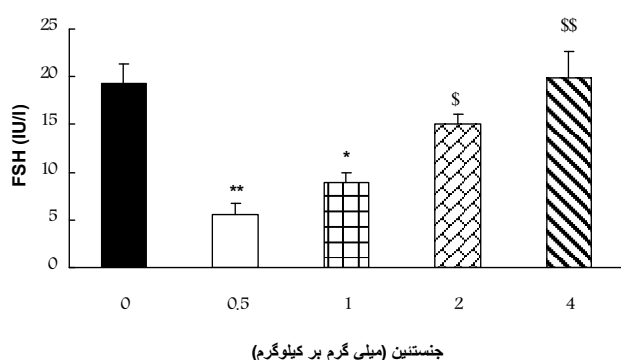
Fukutake و همکاران نشان دادند که کاهش اسپرم با مصرف سویا ارتباط مستقیم دارد. به این ترتیب که اختلال در ساختار اسپرم و کاهش کیفیت آن هنگامی اتفاق می افتد که سطح پلاسمایی آندروژن ها کاهش و استروژن افزایش یافته باشد. در واقع کاهش آندروژن ها سبب می گردد که سلول های سرتولی نقش خود را به خوبی انجام ندهند که این امر منجر به بروز اختلال در تمایز سلول های ژرمینال می گردد (۱۷).

Ohno و همکاران نیز اثر جنیستین را در این مورد بررسی کرده و دریافتند که تجویز مقادیر زیاد جنیستین بر تولید هورمون های کورتیکوسترون و (LH) موش صحرایی بیشتر از تاثیر آن بر تولید تستوسترون می باشد (۱۵). **Lund** و همکارانش نیز نشان دادند که فیتواستروژن موجود در رژیم غذایی حاوی سویا، از طریق تأثیر بر گیرنده های استروژن موجب کاهش بیان ژن گیرنده های آندروژنی و در نتیجه کاهش رشد پروستات می شود (۲۲). از طرف دیگر **Adachi** و همکاران نشان دادند که تزریق زیر پوستی جنیستین، هیچگونه تأثیری بر مورفولوژی دستگاه تناسلی موش صحرایی نر ندارد (۱۴). اما **Glover** و همکاران مشاهده کردند که تجویز جنیستین باروری در موش های صحرایی نر بالغ را بطور واضحی کاهش می دهد (۲۳). در مطالعه **Perry** و همکاران که ۹۱ میمون نر به مدت ۳ سال در معرض رژیم با مقادیر مختلف جنیستین قرار گرفتند، نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز این ترکیب تفاوت آشکاری در ارگانهای تولید مثلی ایجاد نمی کند (۲۰).

همانگونه که عنوان شد سویا و جنیستین موجود در آن می تواند اثرات متفاوتی بر ساختار و عملکرد سیستم تناسلی داشته باشد. از طرف دیگر امروزه مصرف ترکیبات حاوی سویا در رژیم غذایی افراد افزایش یافته ولی علیرغم تحقیقات گسترده بر روی جنیستین، هنوز محققان به یک توافق نظر در مورد اثر آن بر سیستم تولید مثل مذکر نرسیده اند. بنابراین ماهیت عمل جنیستین بر روی سیستم تولید مثل در ابهام قرار داشته و نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه را ضروری می سازد. لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر جنیستین بر اسپرماتوژن موش صحرایی انجام شد.

مواد و روشها

حیوان آزمایشگاهی: در این مطالعه تجربی از ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن حدود ۱۳ هفته و محدوده وزنی بین ۲۵۰-۲۲۰ گرم که از موسسه رازی تهران خریداری شدند، استفاده شد. کلیه موشها به مدت یک هفته در شرایط نگهداری جدید قرار گرفته، آب و غذا بصورت آزاد در اختیار آنها قرار داده شد و میزان نور اطلاق به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی تنظیم گردید. دمای محیط 22 ± 2 درجه سانتیگراد بود و در هر قفس ۲ سر موش نگهداری شد.



نمودار ۱. تأثیر تجویز دوزهای مختلف Genistein بر روی سطح پلاسمایی هورمون FSH.

* $p < 0.05$ و ** $p < 0.01$ نسبت به گروه شاهد (دوز صفر). $^S p < 0.05$ و $^{SS} p < 0.01$ نسبت به گروه جنسیتین (۰/۵ mg/kg).

جدول ۱: اثرات تجویز داخل صفاقی دوزهای مختلف جنسیتین بر شاخصه های اسپرم و غلظت پلاسمایی هورمونهای جنسی (تستوسترون، FSH و LH) موشهای صحرایی نر

دوز جنسیتین mg/kg	۰/۵	۱	۲	۴	صفر
شاخصه های اسپرم					
تعداد اسپرم (میلیون در میلی لیتر مایع منی)	۲۹/۲۲±۴/۷۳	۲۴/۰۴±۴/۰۶	۱۲/۳۵±۳/۸۷	۱۴/۲۳±۴/۹	۱۶/۴۴±۲/۵۷
قابلیت زنده ماندن (درصد)	۹۳/۴±۰/۸۱	۹۲/۲۲±۰/۵۲	۹۵±۰/۹۶	۷۴±۱۸/۵	۹۴/۷±۰/۹
غلظت پلاسمایی هورمونهای جنسی					
تستوسترون (نانوگرم در میلی لیتر)	۲/۸±۱/۰۹	۲/۹۶±۰/۶۲	۵/۳۶±۱/۴۸	۳/۵۲±۱/۷۹	۴/۷۸±۰/۸
FSH (IU/l)	۵/۵۲±۱/۲**	۸/۸۶±۱/۱۱*	۱۵/۱۲±۱ ^S	۱۹/۹±۲/۷۵ ^{SS}	۱۹/۳۴±۲
LH (IU/L)	۰/۱۵±۰/۰۲	۰/۱۳±۰/۰۱	۰/۱۹±۰/۰۲	۰/۲۲±۰/۰۶	۰/۱۹±۰/۰۳

† حیوانات تحت تجویز دوزهای مختلف جنسیتین (۰/۵ و ۱ و ۲ و ۴ mg/kg, i.p.) قرار گرفتند. هر نقطه Mean±SE در ۵ سر موش صحرایی نر است. * $p < 0.05$ و ** $p < 0.01$ نسبت به گروه شاهد (دوز صفر) و $^S p < 0.05$ و $^{SS} p < 0.01$ نسبت به گروه جنسیتین (۰/۵ mg/kg).

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که تجویز دوزهای مختلف جنسیتین به عنوان یک فیتواستروژن موجود در سویا فقط بر سطح پلاسمایی هورمون FSH در موش صحرایی نر موثر است و تأثیر معنی داری بر سطح پلاسمایی هورمون های LH و تستوسترون و شاخصه های مختلف اسپرم شامل تعداد اسپرم و قابلیت زنده ماندن آنها ندارد. بدین ترتیب که در دوزهای پائین (۰/۵ و ۱ mg/kg) باعث کاهش معنی دار سطح پلاسمایی هورمون FSH شده و افزایش دوز جنسیتین به صورت پلکانی این اثر مهار را کاهش داد. به طوری که سطح پلاسمایی هورمون FSH با تجویز دوز ۴ mg/kg جنسیتین تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت. لذا به نظر می رسد که جنسیتین در دوزهای پائین اثر کاهشی در سطح پلاسمایی FSH دارد.

Cicero و همکاران نشان دادند که تجویز مکمل غذایی حاوی ایزوفلاون تأثیر معنی داری بر سطح پلاسمایی هورمون FSH در موش صحرایی نر بالغ ندارد (۲۸). نتایج مشابه ای در مطالعه Roberts و همکاران (۱۸) و Glover و

همکاران (۲۳) نیز گزارش شده است. این نتایج با اطلاعات حاصل از بی اثری دوزهای بالای جنسیتین بر سطح پلاسمایی هورمون FSH در مطالعه حاضر هم خوانی دارد، در این مطالعه دوزهای پائین جنسیتین باعث کاهش سطح پلاسمایی هورمون FSH شد.

در این مطالعه همچنین مشخص شد که جنسیتین بر سطح پلاسمایی هورمون LH تأثیری ندارد. Weber و همکاران گزارش نمودند که تجویز ایزوفلاون در رژیم غذایی موش صحرایی نر بالغ تأثیری بر سطح پلاسمایی هورمون LH ندارد (۲۹). مطالعه Mitchell و همکاران نیز نتایج مشابه ای را در رابطه با اثرات مکمل غذایی فیتواستروژنها نشان داد (۲۱). نتایج این مطالعات با اطلاعات حاصل از مطالعه حاضر هم خوانی ندارد. از طرفی نتایج تحقیقات Cicero نشان داد که مکمل غذایی حاوی ایزوفلاون در موش صحرایی های نر بالغ باعث کاهش سطح هورمون LH در گروهی که دوز بالای ایزوفلاون را دریافت کرده بود، گردید (۲۸). Ohno و همکاران دریافتند که

شیردهی بر روی فرزندان مذکر بررسی کرد. در نهایت تأثیر قابل توجهی بر پارامترهای اسپرم از جمله تعداد اسپرم مشاهده نکرد (۱۹). اما Lee اثرات در معرض جنیستین قرار گرفتن را بر روی سیستم تولید مثلی موش های نر در دوران تکامل وابسته به بلوغ مورد بررسی قرار داد، نتایج بدست آمده نشان داد که تعداد اسپرم در اپیدیدیم در فرزندان مذکر که مادرانشان در معرض جنیستین بوده اند، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشت (۲۶). Goyal نشان داد که تجویز استروژن های صناعی در موش های صحرایی بالغ تعداد اسپرم اپیدیدیم و سطح باروری را کاهش می دهد (۱۱). لذا در این مطالعه حیوان نر مستقیماً تحت تجویز جنیستین قرار نگرفته و لذا احتمال دارد که این ترکیب بر ماحصل تکاملی سیستم تناسلی جنین تأثیر گذاشته و باعث کاهش تعداد اسپرم ها در نوزادان مذکر شده باشد. به طور خلاصه نتایج این مطالعه تأثیر منفی تجویز دوزهای پائین جنیستین را بر سطح پلاسمایی هورمون FSH نشان داد. اما تجویز جنیستین تأثیری بر سایر شاخصه های اندازه گیری شده نداشت. بدیهی است تعیین مکانیسم های موثر در ایجاد پدیده های ذکر شده نیازمند مطالعات تکمیلی است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه جهت تأمین هزینه انجام این تحقیق و دکتر علی پورمتعبد و خانم تهمینه مختاری قدرانی می گردد.

تجویز مقادیر زیاد جنیستین بر تولید هورمون کورتیکوسترون آدرنال و بیضه موش های صحرایی تأثیر دارد مخصوصاً بر روی غلظت LH و کورتیکوسترون سرم و این اثر بر غده آدرنال بیشتر از بیضه بود (۱۵). لذا احتمال می رود که محدوده دوز جنیستین در آن مطالعه (۱۰۴۰ mg/kg) که بسیار بالاتر از دوز آن در مطالعه حاضر می باشد باعث کاهش سطح پلاسمایی LH شده باشد. به هر حال در دوزهای استفاده شده دارو، در مطالعه حاضر این اثرات مهاری ملاحظه نشد. در این رابطه در مطالعه ما غلظت پلاسمایی هورمون تستوسترون نیز تحت تأثیر تجویز جنیستین قرار نگرفت. Ohno (۱۵) و Glover (۲۳) با تجویز مقادیر زیاد جنیستین و Weber (۲۹) با تجویز فیتواستروژن بی اثری این ترکیبات را بر سطح پلاسمایی LH گزارش نمودند. اما Cicero گزارش کرد که تجویز خوراکی دوز بالای ایزوفلاون سطح پلاسمایی این هورمون را کاهش می دهد (۲۸). تناقض اطلاعات حاصل از مطالعه مذکور با نتایج مطالعه ما نیز احتمالاً ناشی از تفاوت دوز و یا تفاوت در ترکیب مورد مطالعه می باشد. در این مطالعه تعداد و قابلیت زنده ماندن اسپرم در هیچ یک در گروهها تفاوت معنی داری نداشت. در مطالعه Mitchell و همکارانش که اثرات مکمل غذایی فیتواستروژن به طور کوتاه مدت بر روی کیفیت مایع سمن و سطح استروئید و گنادوتروپین های پلازما در مرد ها مورد ارزیابی قرار گرفت، اثرات واضحی بر روی پارامتر های مایع سمن در طی این مطالعه دیده نشد و نتیجه گرفتند که مصرف فیتواستروژن ها تأثیری بر کیفیت مایع سمن ندارد (۲۱). Fielden هم در مطالعه ای که تأثیر جنیستین را در دوران بارداری و

Genistein Effect on Sex Hormones, Sperm Count and Sperm Viability in Male Rats

R. Ghorbani (PhD)¹, S. Ghanbari (MSc)², M. Khazaei (PhD)¹, C. Jalili (PhD)^{3*}

1. Fertility and Infertility Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2. Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3. Anatomy Department, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

J Babol Univ Med Sci; 13(6); Nov 2011

Received: Dec 11th 2010, Revised: Feb 9th 2011, Accepted: Apr 27th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Genistein is a soya phytoestrogen having estrogenic effects. Phytoestrogen has been introduced as one of the elements of unproductively in some animals, but previous studies on genistein role in male reproductive system have shown contradictory results. Since no similar study has taken place in Iran, the present study has been designed for evaluation of genistein effects on male reproductive system.

METHODS: In this experimental study, 30 male rats with 13 weeks of age and limited weight of 220 to 250 grams were selected. They were divided into six groups of 5, and different genistein doses (0, 0.5, 1, 2, 4 mg/kg) were injected subcutaneously on 14 consecutive days to male rats. After 24 hours animal were killed and then their blood testosterone, FSH (follicle-stimulating hormone), and (LH Luteinizing hormone) were measured via ELAISA method. Sperm count and viability were measured through WHO protocols.

FINDINGS: There was a significant reduction in FSH plasma levels among groups that were injected low doses of genistein while by increasing the genistein dose the inhibitory effect of reducing became slower ($p < 0.05$). There were not any significant differences between other indicators.

CONCLUSION: Based on our findings, genistein has an effect on FSH level of plasma and the functioning of male reproductive system.

KEY WORDS: *Genistein, Phytoestrogen, Testosterone, Sperm count, Rat.*

*Corresponding Author;

Address: Department of Anatomy, Medical School, Parastar St., Kermanshah, Iran

Tel: +98 831 4274618-20

E-mail: cjalili@kums.ac.ir

References

1. Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* 2006;114(4):567-72.
2. Lamartiniere CA, Murrill WB, Manzillo PA, et al. Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217(3):358-64.
3. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 1999;129(3):758-67.
4. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3):863-70.
5. Privat M, Aubel C, Arnould S, Communal Y, Ferrara M, Bignon YJ. Breast cancer cell response to genistein is conditioned by BRCA1 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379(3):785-9.
6. Zhao R, Xiang N, Domann FE, Zhong W. Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 2009;61(3):397-407.
7. Notarnicola M, Messa C, Orlando A, et al. Effect of genistein on cholesterol metabolism-related genes in a colon cancer cell line. *Genes Nutr* 2008;3(1):35-40.
8. Webb CM, Hayward CS, Mason MJ, Ilsley CD, Collins P. Coronary vasomotor and blood flow responses to isoflavone-intact soya protein in subjects with coronary heart disease or risk factors for coronary heart disease. *Clin Sci (Lond)* 2008;115(12):353-9.
9. Choi MS, Jung UJ, Yeo J, Kim MJ, Lee MK. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24(1):74-81.
10. Samiei H, Sina S. Comparison of the therapeutic effects of soybeans with HRT on menopausal syndrome manifestations. *J Babol Univ Med Sci* 2005;7(28):36-43. [in Persian]
11. Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod* 2003;68(6):2081-91.
12. Sharpe RM, Rivas A, Walker M, McKinnell C, Fisher JS. Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *Int J Androl* 2003;26(1):26-36.
13. Hancock KD, Coleman ES, Tao YX, et al. Genistein decreases androgen biosynthesis in rat Leydig cells by interference with luteinizing hormone-dependent signaling. *Toxicol Lett* 2009;184(3):169-75.
14. Adachi T, Ono Y, Koh KB, et al. Long-term alteration of gene expression without morphological change in testis after neonatal exposure to genistein in mice: toxicogenomic analysis using cDNA microarray. *Food Chem Toxicol* 2004;42(3):445-52.
15. Ohno S, Nakajima Y, Inoue K, Nakazawa H, Nakajin S. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. *Life Sci* 2003; 74(6): 733-42.
16. Tao J, Zhang Y, Li S, Sun W, Soong TW. Tyrosine kinase-independent inhibition by genistein on spermatogenic T-type calcium channels attenuates mouse sperm motility and acrosome reaction. *Cell Calcium* 2009; 45(2): 133-43.
17. Fukutake M, Takahashi M, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem Toxicol* 1996;34(5):457-61.
18. Roberts D, Veeramachaneni DN, Schlaff WD, Awoniyi CA. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine* 2000;13(3):281-6.

19. Fielden MR, Samy SM, Chou KC, Zacharewski TR. Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(4):447-54.
20. Perry DL, Spedick JM, McCoy TP, Adams MR, Franke AA, Cline JM. Dietary soy protein containing isoflavonoids does not adversely affect the reproductive tract of male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J Nutr* 2007;137(6):1390-4.
21. Mitchell JH, Cawood E, Kinniburgh D, Provan A, Collins AR, Irvine DS. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clin Sci (Lond)* 2001;100(6):613-8.
22. Lund TD, Munson DJ, Adlercreutz H, Handa RJ, Lephart ED. Androgen receptor expression in the rat prostate is down-regulated by dietary phytoestrogens. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:5.
23. Glover A, Assinder SJ. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *J Endocrinol* 2006;189(3):565-73.
24. Jefferson WN, Padilla-Banks E, Goulding EH, Lao SP, Newbold RR, Williams CJ. Neonatal exposure to genistein disrupts ability of female mouse reproductive tract to support preimplantation embryo development and implantation. *Biol Reprod* 2009;80(3):425-31.
25. Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 2001;61(11):4325-8.
26. Lee BJ, Jung EY, Yun YW, et al. Effects of exposure to genistein during pubertal development on the reproductive system of male mice. *J Reprod Dev* 2004;50(4):399-409.
27. Hughes CL, Liu G, Beall S, Foster WG, Davis V. Effects of genistein or soy milk during late gestation and lactation on adult uterine organization in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229(1):108-17.
28. Cicero AF, Derosa G, Arletti R. Effect of oral chronic isoflavones supplementation on male rat sexual performances and sexual hormone plasma levels. *Phytother Res* 2004;18(10):849-52.
29. Weber KS, Setchell KD, Stocco DM, Lephart ED. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol* 2001;170(3):591-9.