ORIGINAL ARTICLE

The Effect of Chronic Immobilization Stress and Royal Jelly on Level of Steroid Hormones, Cortisol and Histological Changes in Uterine Tissue in Female Mice

Fatemeh Nahavandi[1],
Vahid Nejati[2],
Gholamreza Najafi[3]

[1] MSc Student in Embryology and Histology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received Jul 16, 2014 ; Accepted October 14, 2014)

Abstract

Background and purpose: Chronic stress is known as a state that disrupts the body homeostasis that could cause significant behavioral and hormonal changes. In this study the changes in estrogen, progesterone, cortisol, and testosterone hormonal level and histological changes in uterus tissue induced by immobilization stress were studied. Also, the protective effect of royal jelly was investigated.

Materials and methods: In this study, 40 female mice were divided into 5 groups of 8 including: 1- control, 2- mice subjected to 63 days of 2 hour immobilization stress daily, Groups 3, 4, and 5 that were subjected to immobilization stress and received royal jelly orally at the dose of 50, 100 and 200 mg/kg body weight, respectively. At the end of treatment, the mice were sacrificed, serum was separated and the level of serum cortisol, estrogen, progesterone and testosterone was measured using ELISA method. The uterine horn was also removed and after preparing tissue sections and performing H&E staining they were studied by light microscopy.

Results: The levels of serum estrogen, cortisol and testosterone hormones of stressed group increased compared to those of the control group, while the amount of progesterone decreased. In royal jelly- treated groups, the levels of estrogen, testosterone and cortisol reduced but the level of progesterone increased. Also, the study of uterine horn tissue indicated histological changes in stressed group compared to those of the controls. In groups treated with royal jelly, these changes were lower and the uterine tissue was similar to that of the control group.

Conclusion: Royal Jelly improved the hormonal and histological changes due to immobilization stress

Keywords: Mice, royal jelly, stress, uterine horn

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(114): 60-70 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۸ آبان سال ۱۳۹۳ (۷۰-۶۰)

تاثیر استرس بی حرکتی مزمن و ژل رویال بر میزان هورمون های استروئیدی، کورتیزول و تغییرات بافتی رحم در موش سوری ماده

فاطمه نهاوندی[۱]
وحید نجاتی[۲]
غلامرضا نجفی تازه کند[۳]

چکیده

سابقه و هدف: استرس مزمن به عنوان حالتی شناخته شده است، که هومئوستاز بدن را به هم می‌زند و شامل تغییرات رفتاری و هورمونی قابل توجه است. در این مطالعه تغییرات هورمون‌های استروژن، پروژسترون، کورتیزول و تستوسترون و تغییرات بافتی ناشی از استرس بی‌حرکتی در شاخ رحم و نقش حفاظتی ژل رویال مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۴۰ راس موش سوری ماده در ۵ گروه ۸ تایی شامل ۱- کنترل ۲- موش‌هایی که به مدت ۶۳ روز، روزانه ۲ ساعت تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند. گروه‌های ۳، ۴ و ۵ که علاوه بر استرس بی‌حرکتی ژل رویال را به ترتیب در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg وزن موش به صورت خوراکی دریافت کردند، تقسیم شدند. در پایان تیمار موش‌ها آسان کشی شده و سرم جدا و سطح سرمی هورمون‌های کورتیزول، استروژن، پروژسترون و تستوسترون توسط روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. قسمت شاخ رحم نیز جدا و پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی H&E توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: سطح سرمی هورمون‌های استروژن، کورتیزول و تستوسترون در گروه استرس بی‌حرکتی نسبت به گروه کنترل افزایش و میزان پروژسترون کاهش یافت. درگروه‌های دریافت‌کننده ژل رویال میزان استروژن، کورتیزول و تستوسترون کاهش و پروژسترون افزایش یافت. بررسی های بافتی شاخ رحم نیز نشان دهنده تغییرات بافتی در گروه استرس نسبت به گروه کنترل بود که در گروه های تیمار شده با ژل رویال این تغییرات کم و بافت رحم به گروه کنترل شبیه بود.

استنتاج: ژل رویال باعث بهبود تغییرات هورمونی و بافتی ناشی از استرس بی‌حرکتی در موش‌های سوری ماده می‌شود.

واژه های کلیدی: استرس، ژل رویال، موش سوری، شاخ رحم

مقدمه

استرس تبدیل به بخش جدایی‌ناپذیر از وضعیت بشر در سراسر جهان و هر فردی شده است. به احتمال زیاد روبرو شدن با استرس در زندگی، باعث آشفتگی تعادل فیزیولوژیکی و روانی می‌شود(۱). استرس باعث ایجاد تغییرات قابل توجه در رفتاری، غدد درون‌ریز، نورون‌ها و سیستم ایمنولوژیکی می‌شود(۲).

مولف مسئول: فاطمه نهاوندی- ارومیه: دانشجوی دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی E-mail: fatemenahan@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه آناتومی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۶/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۷/۲۲

استرس و اختلالات روانی با فعال کردن مسیر هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- آدرنالی[1] (HPA) توانایی مهار مسیر هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- گنادی[2] (HPG) را دارد، که در صورت کافی بودن شدت آن، ممکن است منجر به سرکوب چرخه‌ی نرمال قاعدگی شود، که این عارضه به سندرم آمنوره عملکردی هیپوتالاموس یا عدم تخمک‌گذاری مزمن هیپوتالاموس معروف است و از آن جایی که وقایع نورواندوکرین، مسئول تخمک گذاری اند، کاهش ترشح GnRH[3] از هیپوتالاموس در زنان مبتلا به این سندرم، معمولا کاهش قابل توجهی در فرکانس پالس LH[4] از هیپوفیز را نشان می‌دهد، و از آن جایی‌که فولیکولوژنز مناسب نیاز به پالس گنادوتروپین‌ها (LH) دارد، کاهش در فرکانس پالس LH-GnRH منجر به کمبود در فولیکولوژنز و قاعدگی غیر طبیعی و ناباروری می‌شود(۳). ناباروری ناتوانی یک زن و شوهر در دستیابی به حاملگی است. ناباروری هم چنین به عنوان ناتوانی در به پایان رساندن حاملگی تعریف شده است. ناباروری می‌تواند دارای علل زنانه، مردانه یا هر دو، اولیه یا ثانویه باشد(۴). در طی چرخه استروس تغییر در هورمون‌های استروئیدی تخمدان باعث تغییر در بافت رحم می‌شود، که در رحم غیر باردار اثرات استروژن در طی فاز فولیکولار غالب است، در حالی که پروژسترون در طی فاز تکثیر غالب است. این استروئیدها می‌توانند تکثیر سلول‌های رحم و بازسازی بافت‌ها را تحت تاثیر قرار دهند، که برای آماده‌سازی رحم برای لانه‌گزینی و حمایت از رشد جنین و تشکیل جفت ضروری است(۸). وقتی که پاسخ به استرس (کورتیزول) افزایش می‌یابد، این افزایش با افت شدید پروژسترون همراه است. درحالی که استروژن در همان سطح خود باقی می‌ماند(۶). هم چنین استرس باعث اختلال در فرآیند استروئیدوژنز و مختل شدن پیک پروژسترون پیش از تخمک‌گذاری و در نتیجه مختل شدن رفتارهای سیکل استروس می‌شود(۷). گلوکوکورتیکوئیدها به صورت آشکار از رشد ناشی از اثر تحریکی استروژن بر روی رحم از طریق کاهش دادن گیرنده‌های استروژن جلوگیری می‌کنند(۹). استرس در جنس ماده باعث افزایش میزان تستوسترون می شود، در حالی که در جنس نر باعث کاهش این مقدار می‌گردد(۱۰). استروژن دارای اثر تحریکی در سنتز و آزادسازی هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRH)[5] است. افزایش حاد در سطح پلاسمایی هورمون استروژن در زنان باعث افزایش mRNA CRH و سنتز CRH در هیپوتالاموس می‌شود. در مقابل مطالعات نشان می‌دهد که تستوسترون باعث سرکوب افزایش کورتیکوتروپین می‌شود(۱۱). پس افزایش تستوسترون باعث مهار افزایش کورتیکوتروپین و ACTH[6] از هیپوفیز می‌شود، تا بدن را با استرس آداپته کند. در حالی که افزایش استروژن از آداپته شدن بدن با استرس جلوگیری می‌کند. ژل رویال محصول ترشحی غدد سری زنبوران پرستار بوده که به عنوان مهم‌ترین بخش تغذیه لارو زنبور شناسایی شده و نقش مهمی در تمایز طبقه زنبورها بازی می‌کند(۱۲). این ماده به دلیل ترکیباتی که دارد (آب، پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها، نمک‌های معدنی، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، هورمون‌ها وآنتی‌بیوتیک‌های طبیعی) دارای خواص داروئی زیادی شامل: آنتی‌اکسیدان، نوروتروفیک، کاهش فشار خون، ضد تومور، ضدالتهاب و است. ژل رویال به لاروها اجازه توسعه کامل از سلول‌های جنینی را می‌دهد و توان تخمک‌گذاری را در ملکه در تمام طول عمر حفظ می‌کند، و این خاصیت غیر عادی ژل رویال به عنوان محرک باروری استفاده می‌شود(۱۲). ژل رویال برای بهبود تعادل هورمونی و باروری در نرها و ماده‌ها با افزایش کیفیت اسپرم و تخمک موثر است(۱۲). هم‌چنین

1. Hypothalamic–pituitary–adrenal
2. Hypothalamic–pituitary–gonadal
3. Gonadotropin-releasing hormone
4. Luteinizing hormone
5. Corticotrophin -releasing hormone
6. Adrenocorticotropic hormone

ژل رویال یک منبع مهم پاراآمینوبنزوئیک اسید است که باروری را در جنس ماده افزایش می‌دهد(۱۴). چندین اسید چرب در ژل رویال وجود دارد که رفتار استروژن را تقلید می‌کنند(۱۴). اما ژل رویال دارای فعالیت استروژنی کمی است و به کمک تعامل با گیرنده‌های استروژن منجر به تغییر بیان ژن و تکثیر سلول می‌شود(۱۳). هم چنین مطالعات مختلف نتایج قابل مقایسه تجویز ژل رویال و پروژسترون بر بهبود پاسخ‌های استرسی و میزان بارداری را نشان دادند(۱۵). هدف از این پژوهش بررسی تاثیر استرس بی حرکتی بر روی میزان هورمون‌های استروژن، پروژسترون، تستوسترون و کورتیزول سرم و تغییرات بافتی قسمت‌های آندومتر، میومتر و تعداد غدد موجود در آندومتر شاخ رحم موش سوری ماده (ناشی از تغییر در میزان هورمون‌های فوق) و بررسی اثرات حفاظتی ژل رویال بر این تغییرات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط آزمایش: در این مطالعه تجربی، از ۴۰ راس موش سوری ماده با وزن حدود ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد. حیوانات از مرکز پرورش و نگه‌داری حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شدند. شرایط اتاق ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دما ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۲۵ تا ۳۰ درصد بود. موش ها به مدت ۲ هفته در این شرایط نگه‌داری شدند تا به شرایط محیط عادت کنند. حیوانات در قفس‌های مخصوص پرورش و نگهداری شده و به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. لازم به ذکر است در برخورد با حیوانات، کلیه موازین اخلاقی بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) رعایت گردیده است. به منظور انجام این پژوهش، موش‌ها به طور تصادفی به ۵ دسته ۸ تایی گروه‌بندی شدند: شامل: ۱- گروه کنترل که آب و غذای معمولی دریافت می‌کردند و تحت هیچ استرس و تیماری قرار نگرفتند. ۲- گروه استرس بی‌حرکتی که علاوه بر آب و غذای معمولی، ۶۳ روز و روزانه ۲ ساعت تحت استرس بی‌حرکتی قرار می گرفتند. گروه‌های۳، ۴ و ۵ گروه‌های تیمار شده با ژل رویال، که علاوه بر آب و غذای معمولی و استرس بی حرکتی روزانه، به مدت ۶۳ روز ژل رویال را به ترتیب در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg وزن موش به صورت خوراکی (گاواژ) دریافت کردند، تقسیم بندی شدند. با توجه به مطالعات انجام شده روی دوزهای مختلف ژل رویال، مشخص گردیده است که دوزهای پایین و بالای ژل رویال دارای اثرات مثبت کمی هستند و حتی دوزهای بسیار بالا دارای اثرات مخرب نیز می‌باشند ولی زمانی که از دوز متوسط ژل رویال استفاده می‌شود، این دوز دارای بیش‌ترین اثرات مثبت است. بنابراین در این مطالعه از ۳ دوز مختلف استفاده شد تا مشخص شود که موثرترین دوز کدام است(۳۱).

طریقه القای استرس بی‌حرکتی(۱۶): برای القای استرس بی‌حرکتی از مهارکننده‌های مخصوص (دستگاه ریسترینر) که متناسب با اندازه موش‌های سوری انتخاب شده بود، استفاده شد. به طوری که موش‌ها درون آن قابلیت حرکت را تا حد ممکن از دست دهند. موش‌های سوری را روزانه به مدت ۲ ساعت در درون این مهار کننده‌ها قرار داده و تا حد امکان از تاثیر عوامل استرس‌زای دیگر مانند صدا و تغییرات نوری و دمایی بر آن‌ها جلوگیری به عمل آمد. پس از پایان القای استرس، حیوانات به قفس‌های خود برگردانده می‌شدند. در پایان ۶۳ روز دوره تیمار، تمامی حیوانات پس از تعیین سیکل جنسی توسط نمونه‌گیری از ترشحات واژن و مشاهده سلول‌های موجود در اسمیر واژینال در زیر میکروسکوپ نوری، همگی در فاز استروس سیکل جنسی در یک ظرف مخصوص بیهوش شدند و پس از خون‌گیری از قلب، سرم آن توسط سانتریفوژ جدا شده، سپس غلظت سرمی هورمون‌های استروژن، پروژسترون، تستوسترون و کورتیزول توسط روش الایزا اندازه گیری

شد. قسمت شاخ رحم نیز برای بررسی‌های بافتی جدا شده و داخل فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. پس از فیکس شدن، نمونه‌ها توسط پارافین قالب گیری و با استفاده میکروتوم، مقاطع با ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین- ئوزین رنگ‌آمیزی گردید. لام‌های رنگ‌آمیزی شده برای بررسی‌های مورفومتریک ضخامت لایه های میومتر و اندومتر، هم چنین تعداد غدد موجود در آندومتر در هر میدان دید، با بزرگ نمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

روش تجزیه وتحلیل داده ها

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ و آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) و تست توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلاف $p < ۰/۰۵$ بین گروه‌های مورد آزمایش از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

یافته‌های بیوشیمیایی:

باتوجه به جدول شماره ۱، نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی فاکتورهای سرم نشان داد که غلظت سرمی هورمون‌های استروژن، تستوسترون و کورتیزول در گروه تحت استرس نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($p < ۰/۰۵$). در حالی که در گروه‌های تیمار شده با ژل رویال این مقدار نسبت به گروه استرس کاهش نشان داد، که میزان استروژن در گروه ژل رویال دوز ۱۰۰ mg\kg و ۵۰ نسبت به گروه استرس کاهش یافته و دارای اختلاف معنی‌دار با گروه استرس و اختلاف غیر معنی‌دار با گروه کنترل بود. ولی گروه ژل رویال ۲۰۰ mg\kg، با وجود کاهش نسبت به گروه استرس، دارای اختلاف معنی‌داری با آن نبود. میزان کورتیزول نیز درگروه ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg\kg، نسبت به گروه استرس، کاهش یافته و دارای اختلاف معنی دار با گروه استرس و اختلاف غیرمعنی‌دار باگروه کنترل بود. در حالی که در گروه ۵۰ mg\kg با گروه استرس اختلاف معنی‌داری نداشت و گروه ژل رویال ۲۰۰ mg\kg دارای اختلاف معنی‌دار با همه گروه‌های دیگر بود. میزان تستوسترون نیز در دو گروه ۵۰ mg\kg و ۲۰۰ ژل رویال با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت و در گروه ۱۰۰ mg\kg نیز از گروه کنترل کم تر بوده و دارای اختلاف معنی‌دار با کنترل و گروه استرس بود. میزان هورمون پروژسترون نیز در گروه استرس نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. در گروه‌های تحت تیمار این میزان نسبت به گروه استرس افزایش نشان داد که در گروه ژل رویال ۱۰۰mg\kg این افزایش معنی‌دار بوده، و دارای اختلاف غیر معنی‌دار با گروه کنترل بود. گروه‌های ژل رویال ۵۰ mg\kg و ۲۰۰ علی‌رغم افزایش میزان پروژسترون نسبت به گروه استرس، دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بود (جدول شماره ۱).

یافته‌های هیستوپاتولوژیکی:

با توجه به جدول شماره ۲ و تصاویر شماره ۱ تا ۳ بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی عرضی رحم موش‌های سوری گروه کنترل، نشان دهنده آندومتر طبیعی و تعداد غدد فراوان در قسمت آندومتر، هم‌چنین میومتر طبیعی بود. در حالی‌که در گروه تحت استرس بی‌حرکتی مزمن، ضخامت کل آندومتر، ضخامت میومتر و تعداد

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از تغییرات میزان هورمون های استروژن، پروژسترون، تستوسترون و کورتیزول در گروه های مختلف آزمایشی

گروه	کنترل	استرس بی حرکتی	استرس بی حرکتی + ۵۰ میلی گرم ژل رویال	استرس بی حرکتی + ۱۰۰ میلی گرم ژل رویال	استرس بی حرکتی + ۲۰۰ میلی گرم ژل رویال
استروژن (ng\ml)	۹/۹۶±۰/۵۲^{a}	۱۵/۶۶±۰/۴۶^{b}	۸/۷۳±۰/۴۶^{a}	۸/۱۳±۰/۳۷^{a}	۱۵/۳۳±۰/۳۹^{b}
پروژسترون(pg\ml)	۴۰/۳۳±۱/۲۷^{a}	۲۴/۱۳±۱/۰۳^{b}	۳۲/۸۶±۰/۸۶^{c}	۴۰/۳۰±۰/۹۱^{a}	۳۱/۴۶±۱/۳۶^{c}
کورتیزول(ng\ml)	۱۴/۰۶±۰/۱۲^{a}	۱۶/۴۶±۰/۲۰^{b}	۱۵/۸۰±۰/۱۷^{bc}	۱۳/۵۳±۰/۸۰^{a}	۱۵/۰۰±۰/۱۷^{c}
تستوسترون(ng\ml)	۲±۰/۱۱^{a}	۳/۱۶±۰/۸۸^{b}	۲/۰۳±۰/۸۸^{a}	۱/۴۳±۰/۵۵^{c}	۲/۰۳±۰/۱۲^{a}

a و b و c در داخل جدول نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های مختلف آزمایشی می باشد.

bc در داخل جدول نشان دهنده این می باشد که بین گروه های مختلف آزمایشی اختلاف معنی داری وجود ندارد.

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از تغییرات ضخامت آندومتر، میومتر و تعداد غدد آندومتر در هرمیدان دید با بزرگ نمایی ۴۰۰× در گروه های مختلف آزمایشی

گروه	کنترل	استرس بی حرکتی	استرس بی حرکتی + ۵۰ میلی گرم ژل رویال	استرس بی حرکتی + ۱۰۰ میلی گرم ژل رویال	استرس بی حرکتی + ۲۰۰ میلی گرم ژل رویال
ضخامت آندومتر (µm)	۱۱۱±۲/۰۸^{ab}	۵۵/۶۶±۲/۸۱^{c}	۱۰۳/۴۶±۲/۱۵^{a}	۱۱۵/۶۶±۲/۳۳^{b}	۸۳/۶۶±۲/۳۳^{d}
تعداد غدد آندومتر (در هرمیدان دید با درشت نمایی ۴۰)	۱۱/۳۳±۰/۲۸۴^{a}	۷/۰۲±۰/۲۶۹^{b}	۹/۶۶±۰/۱۷۶^{c}	۱۱/۳۶±۰/۱۸۵^{a}	۷/۶۶±۰/۲۴۰^{b}
ضخامت میومتر	۹۴/۶۶±۲/۶۰^{ab}	۶۳/۵۵±۱/۸۵^{c}	۷۰/۵۶±۰/۹۷^{c}	۱۰۰/۳۶±۱/۴۴^{b}	۸۷/۷۰±۱/۷۹^{a}

a و b و c در داخل جدول نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های مختلف آزمایشی می باشد.

bc در داخل جدول نشان دهنده این می باشد که بین گروه های مختلف آزمایشی اختلاف معنی داری وجود ندارد.

غدد آندومتر نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). در گروه‌های تیمار شده با ژل رویال ضخامت کل بافت آندومتر، میومتر و تعداد غدد نسبت به گروه استرس افزایش یافته بود، به طوری که تعداد غدد در گروه ژل رویال ۱۰۰ mg\kg دارای اختلاف معنی‌دار با گروه استرس و اختلاف غیر معنی‌دار با گروه کنترل بود. گروه ژل رویال ۲۰۰ mg\kg با گروه استرس بی حرکتی اختلاف معنی‌داری نداشت و گروه ژل رویال ۵۰ mg\kg دارای اختلاف معنی‌دار با گروه استرس بود و نسبت به آن افزایش داشت ولی تعداد آن نسبت به گروه کنترل و ژل رویال ۱۰۰ mg\kg کم تر بوده و دارای اختلاف معنی‌دار با آن‌ها بود. ضخامت آندومتر نیز در گروه‌های ژل رویال ۵۰ mg\kg و ۱۰۰ با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت. در گروه ژل رویال ۲۰۰ mg\kg نیز ضخامت آندومتر نسبت به گروه استرس افزایش داشته و دارای اختلاف معنی‌داری با آن بود ولی نسبت به گروه کنترل کم‌تر و دارای اختلاف معنی دار با آن نیز بود. ضخامت میومتر نیز در گروهای ژل رویال ۱۰۰ mg\kg و ۲۰۰ با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت در حالی که گروه ژل رویال ۵۰ mg\kg با گروه استرس اختلاف معنی‌داری نداشت.

بحث

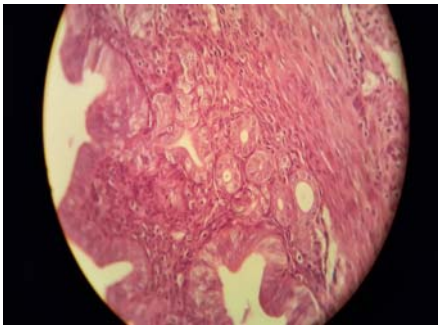
یافته‌های این پژوهش از آنالیز سرم موش‌هایی که تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفته بودند، نشان‌دهنده افزایش میزان کورتیزول نسبت به گروه کنترل بود (جدول شماره ۱). تغییرات محور هیپوتالاموس‌هیپوفیز- آدرنال و تغییرات مرتبط با آن در سطوح گردش گلوکوکورتیکوئیدها یک جزء کلیدی از پاسخ ارگانیسم به چالش های استرس‌زا را تشکیل می‌دهد(۵). محدودیت (بی‌حرکتی) یک روش تجربی برای مطالعه استرس روانی است و باعث افزایش سطح کورتیزول پلاسما می‌شود(۱۷).

Damti و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که استرس می‌تواند الگوهای ترشح کورتیزول را در طی فازهای مختلف سیکل استرس تغییر دهد که در نهایت ترشح هورمون‌های استروئیدی را در مراحل بحرانی فرآیند تولید مثل تحت تاثیر قرار می‌دهد(۱۸). یافته‌های این پژوهش نیز نشان داد که در موش‌هایی که تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند، میزان هورمون پروژسترون سرمی نسبت به گروه کنترل که تحت استرس قرار نگرفته اند، به میزان قابل توجهی کاهش پیدا کرد (جدول شماره ۱) که به دلیل کاهش پالس LH است، چرا که وقتی ترشح LH صورت نگیرد، تخمک‌گذاری اتفاق نمی‌افتد و جسم زردی تشکیل نمی‌شود و در نتیجه ساخته شدن هورمون پروژسترون مختل می‌گردد و میزان آن کاهش پیدا می‌کند. Xiao و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که در میمون‌ها، فعال کردن مسیر هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال در طی فاز لوتئال چرخه قاعدگی میزان LH و در نتیجه پروژسترون را کاهش می‌دهد ولی هیچ تاثیری روی مدت فاز فولیکولی و لوتئال و یا پیک پیش اوولاسیونی استرادیول ندارد(۱۹). نتایج حاصل از آنالیز سطح سرمی

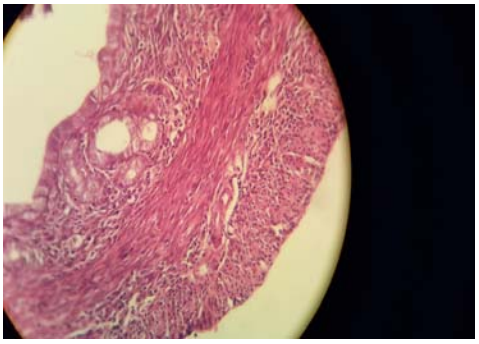
هورمون استروژن گروه‌های مختلف آزمایشی نشان دهنده افزایش میزان هورمون استروژن در گروه‌های تحت استرس بی‌حرکتی نسبت به گروه کنترل بود (جدول شماره ۱). Ringstrom و همکارانش درسال ۱۹۹۲ بیان کردند که افزایش میزان کورتیزول در میزان FSH[1] تغییری ایجاد نمی‌کند و یا باعث افزایش میزان آن می‌شود در حالی که میزان LH کاهش می‌یابد(۲۰). Saraswathi و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۰ دریافتند که استرس بی‌حرکتی موجب کاهش معنی‌دار در طول مدت فاز استروس و متا استروس می‌شود ولی هیچ تغییری در مدت زمان فاز دی استروس ایجاد نمی‌کند و مدت زمان فاز پرواستروس را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد(۲۱). با توجه به مطالب فوق و این که ساخته شدن استروژن در طول فاز پرو استروس صورت می گیرد، پس با طولانی شدن مدت این فاز، میزان ساخته شدن هورمون استروژن افزایش خواهد یافت که یافته های پژوهش حاضر نیز حاکی از این موضوع است (جدول شماره ۱). نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از افزایش میزان پروژسترون در گروه های تیمار شده با ژل رویال در مقایسه با گروه استرس بود (جدول شماره ۱). ژل رویال باعث افزایش پتانسیل جنسی در انسان با تاثیر مستقیم بر تحریک ترشح پروژسترون در ماده ها می‌شود(۲۲). Kridli و همکارانش در سال ۲۰۰۳ دریافتند که ژل رویال دارای پروژسترون اگزوژن است که می تواند باعث افزایش سرعت حاملگی در گوسفند شود(۲۳) هم‌چنین Suzuki و در همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که ژل رویال دارای اثرات گنادوتروپینی می‌باشد که می‌تواند دلیلی برای افزایش معنی‌دار پروژسترون و تنظیم هورمونی ژل رویال باشد(۲۴). با توجه به مشاهدات انجام شده طی این پژوهش (تصاویر شماره ۱ تا ۳) ضخامت لایه‌های میومتر و آندومتر رحم در گروه تحت استرس به میزان چشم گیری کاهش یافت که این به دلیل عدم تاثیر استروژن به دلیل کاهش گیرنده‌های آن و نیز کاهش ترشح پروژسترون وکاهش تاثیرات آن بر روی رحم برای افزایش حجم رحم و تعداد غدد رحم و ورود به فاز ترشحی می‌باشد (جدول شماره ۲). Whirledge و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بیان کردند که گلوکوکورتیکوئیدها به عنوان یک عامل مهم برای تنظیم عملکرد هورمون‌ها در داخل رحم، می‌توانند از رشد ناشی از استروژن رحم و تمایز سلول‌های آن برای لانه‌گزینی ممانعت کنند(۵). Rabin و همکارانش در سال ۱۹۹۰ گزارش دادند که دگزامتازون (یک نوع گلوکوکورتیکوئید) باعث کاهش میزان گیرنده‌های استروژن داخل سیتوسولی و داخل هسته‌ای در رحم می‌شود، در نتیجه کاهش رشد رحم ناشی از اثر گلوکوکورتیکوئیدها، به دلیل کاهش گیرنده های استروژن است(۲۵). نتایج حاصل از بررسی‌های بافتی رحم نشان دهنده افزایش ضخامت لایه‌های رحمی و تعداد غدد آن در گروه‌های تیمار شده با ژل رویال در مقایسه با گروه کنترل بود (جدول شماره ۲و تصاویر شماره ۱ تا ۳). تحقیقات Mishima و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در رابطه با اثر ژل رویال بر بیان ژن های پاسخگو به استروژن درونی مشخص کرد که ژل رویال بیان ژن‌های پاسخگو به استروژن درونی را تحریک می‌کند(۲۶). در نتیجه با بیان این ژن‌ها گیرنده‌های استروژنی افزایش یافته استروژن می‌تواند بر روی رحم تاثیر بگذارد و باعث رشد رحم شود که یافته‌های این پژوهش نیز نشان دهنده این موضوع بود. این امر هم چنین به دلیل افزایش میزان پروژسترون نیز می‌باشد (جدول شماره ۲).

یافته های این پژوهش از آنالیز سرم نیز نشان دهنده افزایش میزان تستوسترون در گروه استرس بی حرکتی نسبت به گروه کنترل بود (جدول شماره ۱). Viau و همکارانش در سال ۱۹۹۶ بیان کردند که در نرها میزان ACTH و کورتیکوسترون نسبت به ماده ها در پاسخ به استرس کاهش پیدا می‌کند که این به دلیل هورمون تستوسترون است. مشابه این حالت در ماده ها نیز رخ

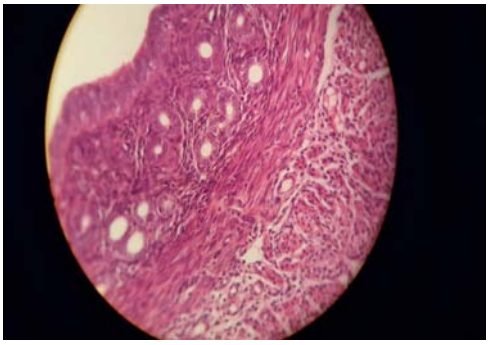
1. Follicle-stimulating hormone



تصویر شماره ۱: برش عرضی از قسمت شاخ رحم گروه کنترل با بزرگ نمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری. فلش آبی نشان دهنده ضخامت لایه آندومتر، فلش سفید نشان دهنده ضخامت لایه میومتر، فلش سیاه نشان دهنده غدد آندومتر می باشد.در این شکل ضخامت آندومتر، میومتر و تعداد غدد طبیعی اند



تصویر شماره ۲: برش‌عرضی ازقسمت شاخ رحم‌گروه استرس بی‌حرکتی با بزرگنمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری. فلش آبی نشان دهنده ضخامت لایه آندومتر، فلش سفید نشان دهنده ضخامت لایه میومتر، فلش سیاه نشان دهنده غدد آندومتر می باشد. در این شکل ضخامت لایه آندومتر، میومتر و تعدادغدد آندومتر نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می دهد.



تصویر شماره۳: برش عرضی از قسمت شاخ رحم گروه استرس بی حرکتی + ۱۰۰میلی گرم ژل رویال. فلش آبی نشان دهنده ضخامت لایه آندومتر، فلش سفید نشان دهنده ضخامت لایه میومتر، فلش سیاه نشان دهنده غدد آندومتر می باشد. در این شکل ضخامت لایه آندومتر، میومتر وتعداد غدد آندومتر نسبت به گروه استرس بی حرکتی افزایش نشان داد و اختلاف معنی داری با مقطع عرضی گروه کنترل نداشت.

می‌دهد که تستوسترون باعث کاهش پاسخ به استرس می‌شود که ناشی از تاثیر مهاری تستوسترون با اثر بر روی هیپوفیز است(۲۷). با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، در گروه‌های تیمار شده با ژل رویال میزان تستوسترون در مقایسه با گروه استرس بی‌حرکتی کاهش نشان داد (جدول شماره ۱). Kamakura و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ژل رویال دارای خاصیت هایپوکلسترولی است که در بیان ژن‌ها دخیل است و در نتیجه باعث کاهش کلسترول و در نتیجه کاهش سنتز تستوسترون می‌شود(۲۸). Kanbur و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نیز بیان کردند که ژل رویال مانع از فعال شدن آنزیم‌های کاتالیزکننده پراکسیداسیون چربی‌های داخل سلولی شده و نیز از بیان سیتوکروم P450 جلوگیری می‌کند که این موضوع می‌تواند دلیلی بر کاهش میزان تستوسترون در گروه‌های تیمار شده با ژل رویال شود(۲۹). هم‌چنین از آن‌جایی‌که استرس باعث افزایش میزان گلوکز برای تامین انرژی مورد نیاز بدن می‌شود، در نتیجه میزان قند خون افزایش می‌یابد. آزمایشات Muenstedt و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که ژل رویال به علت داشتن موادی که از غدد حلقی زنبور عسل تولید می‌شود، فعالیت شبه انسولینی دارد که می‌تواند عامل پایین آورنده قند خون باشد(۳۰). پس این احتمال می‌رود که ژل رویال با پایین آوردن سطح انسولین بدن باعث کاهش مقدار آندروژن ها نیز شود که این موضوع نیز می تواند دلیلی بر کاهش میزان تستوسترون در گروه‌های تیمار شده با ژل رویال باشد (جدول شماره ۱). نتیجه‌گیری کلی از این تحقیق این است که استرس بی‌حرکتی مزمن باعث افزایش میزان کورتیزول می‌شود که آن نیز با تاثیر بر روی محور هیپوتالاموس و هیپوفیز باعث تغییر میزان هورمون‌های استروئیدی می‌شود که این تغییرات با کاهش میزان پروژسترون و افزایش میزان استروژن و تستوسترون همراه است. افزایش کوتیزول هم‌چنین باعث کاهش گیرنده‌های استروژنی روی تخمدان و رحم می‌شود که

کلیه تغییرات فوق موجب عدم تخمک‌گذاری و نیز ممانعت از تاثیر استروژن و پروژسترون بر لایه‌های رحم و در نهایت، تضعیف رحم و ناباروری می‌شود. ژل رویال به علت داشتن ترکیبات شبه هورمونی، با اثرات استروژنی و گنادوتروپینی، توانسته است یک تعادل نسبی هورمونی در سیستم نوروآندوکرینی ایجاد کند، که همین خاصیت ژل رویال می‌تواند باعث بهبود اختلالات هورمونی که خود مهم‌ترین عامل برای عدم تخمک‌گذاری و رشد رحم و در نهایت ناباروری است شود که با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش از بین دوزهای استفاده شده در این پژوهش، موثرترین دوز برای محافظت از اثرات مخرب ناشی از استرس بی‌حرکتی مزمن بر روی میزان هورمون ها و بافت قسمت شاخ رحم دوز ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم ژل رویال می‌باشد و این دوز بیش‌ترین تاثیر مثبت را روی تغییرات هورمونی و بافتی ناشی از استرس بی‌حرکتی دارا بود.

References

1. Kulkarni MP, Juvekar AR. Attenuation of acute and chronic restraint stress induced perturbations in experimental animals by Nelumbo nucifera Gaertn. Indian J of Pharm Scie 2008; 70(3): 327-332.
2. Narayanatara AK, Nagraja HS, Anupama BK.The effect of repeated swimming stress on organ weight and lipid peroxidation in rats. Thai J oF Physiological Sciences 2005; 18(1): 3-9.
3. Ferin M. Clinical review 105: Stress and the Reproductive Cycle. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84(6): 1768-1774.
4. Cooper TG, Noonan E, Eckardstein S, Auger J, Kruger T, Wang C, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human Reproduction Update J 2010; 16(3): 231-245.
5. Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids, Stress, and Fertility. Minerva Endocrinol 2010; 35(2): 109-125.
6. Lovick TA. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. Braz J Med Biol Res 2012; 45(4): 314-320.
7. Madhuranath BN, Yajurvedi HN. Progesterone restores stress induced inhibition of estrous behavior in rat. Indian J Exp Biol 2006; 44(1): 28-31.
8. Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP. Effects of Ovarian Steroids on Uterine Growth, Morphology, and Cell Proliferation in Ovariectomized, Steroid-Treated Ewes. Biol Reprod 1997; 57(3): 588-596.
9. Barton MC, Shapiro DL. Transient administration of estradiol-17 beta establishes an autoregulatory loop permanently inducing estrogen receptor messengerRNA. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85(19): 7119-7123.
10. Fukui H, Yamashita M. The effects of music and visual stress on testosterone and cortisol in men and women. Neuro Endocrinol Lett 2003; 24(3-4): 173-180.
11. Hiroshige T, Abe K, Wada S, Kaneko M. Sex difference in circadian periodicity of CRF activity in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 1973; 11(5): 306-320.
12. Pavel C, Mărghitaş L, Bobiş O, Dezmirean D, Şapcaliu A, Radoi I, et al. Biological Activities of Royal Jelly-Review. Animal Science and Biotechnologies J 2011; 44(2): 108-118.
13. Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, et al. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. J Ethnopharmacol 2005; 101(1-3): 215-220.

14. Suzuki KM, Isohama Y, Maruyama H, Yamada Y, Narita Y, Ohta S, et al. Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly.Evid Based Complement Alternat Med 2008; 5(3): 295-302.
15. Husein MQ, Kridli RT. Reproductive responses following royal jelly treatment administered orally or intramuscularly into progesterone-treated Awassi ewes. Anim Reprod Sci 2002; 74(1-2): 45-53.
16. Mozafar A, Keshavarz M, Zareian P, Johary H, Kargarjahromi H, Hoseini S. The Effect of Immobilization Stress on the HPG Axis (Hypothalamic - Pituitary- Gonad) Hormones and the Number of Spermatogonia. JFUMS 2013; 3(3): 280-284 (Persian).
17. Podsevatkin VG, Kiriukhina SV, Podsevatkin DV, Podsevatkina SV, Blinov DS. Dynamics of the behavioral response and cortisol level caused by the combined action of mexidole, diazepam, thymogen, and hyperbaric oxygenation in mice under immobilization stress conditions. Eksp Klin Farmakol 2008; 71: 22-25.
18. Damti OB, Sarid O, Sheiner E, Zilberstein T, Cwikel J. Stress and distress in infertility among women. Harefuah 2008; 147(3): 256-260, 276.
19. Xiao E, Xia-Zhang LN, Ferin M. Stress and the menstrual cycle: short-and long-term response to a five-day endotoxin challenge during the luteal phase in the rhesus monkey. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84(2): 623-626.
20. Ringstrom SJ, Suter DE, Hostetler JP, Schwartz NB. Cortisol regulates secretion and pituitary content of the two gonadotropins differentially in female rats: effects of gonadotropin-releasing hormone antagonist. Endocrinology 1992; 130(6): 3122-3128.
21. Saraswathi CD, Sreemantula S, Prakash WS. Effect of chronic cold restraint and immobilization stress on estrous cycle in rats. Pharmacologyonline 2010; 2: 151-160.
22. Ragab SS, Ibrahim MK. Evaluation of some chemical, antibacterial and biological properties of fresh and refrigerated royal jelly. Egypt J Microbiol 1999; 34(1): 115-128.
23. Kridli RT, Husein MQ, Humphrey WD. Effect of royal jelly and GnRH on the estrus synchronization and pregnancy rate in ewes using intravaginal sponges. Anim Reprod Sci 2003; 49(1): 25-30.
24. Suzuki KM, Isohama Y, Marayama H, Yamada Y, Narita Y, Ohata S, et al. Estrogenic activities of fatty acids and sterol isolated from royal jelly. Evid Based Complement Alternat Med 2008; 5(3): 295-302.
25. Rabin DS, Johnson EO, Brandon DD, Liapi C, Chrousos GP. Glucocorticoids Inhibit Estradiol-Mediated Uterine Growth: Possible Role of the Uterine estradiol receptor. Biol Reprod 1990; 42(1): 74-80.
26. Mishima S, Suzuki K, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, et al.Royal jlly has estrogenic effects in vitro and in vivo. J Ethnopharmacol 2005; 101(1-3): 215-220.
27. Viau V, Michael MJ. The Inhibitory Effect of testosterone on Hypothalamic-Pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. J Neurosci 1996; 16(5): 1866-l876.
28. Kamakura M, Moriyama T, Sakaki T, Changes in hepatic gene expression associated with the hypocholesterolaemic activity royal jelly. J Pharm Pharmacol 2006; 58(12): 1683-1689.
29. Kanbur M, Eraslan G, Silici BS, Karabacak M. Effecs of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice: Evaluation of the ameliorative effect of royal

jelly applications on these parameters. Food Chem Toxicol 2009; 47(6): 1184-1189.

30. Muenstedt K, Barghello M, Hauensehil A. Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects. J Med Food 2009; 12(5): 1170-1172.

31. Yang A, Zhou M, Zhang L, Xie G, Chen H, Liu Z, et al. Influence of royal jelly on the reproductive function of puberty male rats. Food Chem Toxicol 2012; 50(6): 1834-1840.