Archive of SID

کومش- جلد ۱۷، شماره ۲ (پیاپی ۵۸)، زمستان ۱۳۹٤

اثر حفاظتی عصاره‌ی آبی-الکلی پولیس ایرانی بر تخمدان نوزادان موش صحرائی تحت استرس پس از تولد

عاطفه عرب‌عامری [۱](M.Sc)، حمیدرضا ثامنی [*۲](Ph.D)، احمدرضا بندگی [۳](Ph.D)

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- مرکز تحقیقات فیزیولوژی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استرس دوران نوزادی اثرات گوناگونی بر سیستم‌های مختلف بدن از جمله سیستم عصبی، هورمونی، دفاعی، تولیدمثلی و غیره دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی پولیس بر تغییرات اختاری تخمدان نوزادان موش صحرائی ناشی از استرس دوری مادر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۸ عدد موش صحرائی ماده با سن ۱۵ روز و میانگین وزنی ۲۰-۱۵ گرم تهیه و به طور تصادفی به شش گروه هشت تایی تقسیم شدند. کلیه آزمایش‌ها از روز ۱۵ پس از تولد شروع و در روز ۲۱ پس از تولد پایان یافتند گروه‌ها (کنترل منفی، شاهد نوزادان ۲۱ روزه بدون هرگونه مداخله، گروه دوم (کنترل مثبت) شامل نوزادان ۱۵ روزه بدون استرس همراه با تزریق محلول سالین، گروه سوم (گروه استرس) شامل نوزادان ۱۵ روزه ای که در طی دوره مطالعه به مدت سه ساعت از مادرشان جدا بودند، گروه چهارم تا ششم شامل نوزادان ۱۵ روزه ای که علاوه بر استرس دوری از مادر روزانه به ترتیب به میزان ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی پولیس دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، تخمدان کورتیکوسترون خون اندازه گیری شد. سپس تخمدان‌ها خارج شده و از آنها برشهای ۵ میکرومتری تهیه شد. با روشهای H&E و PAS رنگ آمیزی شدند. مقاطع تخمدان با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به نرم افزار آنالیز تصاویر اقدام به هیستومورفومتری شدند.

یافته‌ها: استرس دوری از مادر باعث افزایش غلظت کورتیکوسترون، کاهش تعداد انواع فولیکول‌ها، اووسیت و افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدان نوزادان گردید. استفاده از عصاره آبی-الکلی پولیس باعث کاهش غلظت کورتیکوسترون خون، افزایش تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان، افزایش تعداد اووسیت و کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدان به دنبال استرس نوزادان گردید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره آبی-الکلی پولیس ایرانی به احتمال زیاد ملاحظه‌ای از تغییرات اختاری تخمدان نوزادان موش صحرائی به دنبال استرس جلوگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پولیس، استرس، تخمدان، کورتیکوسترون، موش صحرائی

مقدمه

استرس عبارت از هر واقعه‌ی تهدید کننده‌ای است که باعث بروز پاسخ‌های رفتاری و فیزیولوژیک در فرد شود [۱]. استرس‌های دوران بارداری و پس از تولد با بسیاری از ناهنجاری‌های روانی، رفتاری و شناختی در انسان و حیوانات در ارتباط می‌باشند [۲]. ازانواع استرس می‌توان به استرس فیزیکی (محدودیت حرکتی، شوک کف پا، ورزش، سرما، نور شدید و ...)، استرس متابولیک (هیپوگلیسمی ناشی از انسولین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۶۵۴۲۱۸

Email: hrsameni@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۱۶

www.SID.ir

Archive of SID

و ...)، استرس ایمنولوژیک (عفونت، مصرف سیتوکین‌ها یا اندوتوکسین‌ها و ...)، استرس قلبی عروقی (مصرف نیتروپروسید) و استرس روانی (انزوا یا کناره‌گیری، تعاملات اجتماعی، تعاملات انسانی-حیوانی، محرومیت از خواب و ...) و غیره اشاره کرد [۳].

در شرایط استرسی دو سیستم در بدن فعال می‌شوند: یکی سیستم سمپاتو- آدرنو- مدولار است که به سرعت در هنگام استرس فعال شده و باعث افزایش کاتکول‌آمین‌ها (اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین) در خون می‌شود و دیگری محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال (HPA) می‌باشد [۴] که فعال شدن آن باعث ترشح هورمون آزاد کننده‌ی کورتیکوتروپین (CRH) از هیپوتالاموس شده و منجر به آزادسازی ACTH از غده‌ی هیپوفیز می‌شود که این هورمون نیز با تحریک قشر آدرنال باعث آزادسازی گلوکوکورتیکوئیدها (کورتیکوسترون در جوندگان و کورتیزول در انسان) از آن می‌گردد [۶،۵،۴].

گیرنده گلوکوکورتیکوئیدها در نورون‌های GnRH هیپوتالاموسی و سلول‌های گنادوتروف هیپوفیزی یافت می‌شوند. گلوکوکورتیکوئیدها در غلظتی مشابه حالت استرس، سطح GnRH را در بافت هیپوفیز بلوک کرده و به دنبال آن پاسخ‌پذیری گنادوتروف‌ها به GnRH نیز کاهش می‌یابد که کاهش سطح LH و به تبع آن فقدان تخمک‌گذاری و نقص سیکل چرخه قاعدگی روی می‌دهد [۷].

گلوکوکورتیکوئیدها هم‌چنین از طریق بلوک فعالیت آروماتاز در سلول‌های گرانولوزا باعث کاهش ترشح استروژن می‌شوند که این کاهش نه فقط استروئیدسازی را تحت تاثیر قرار می‌دهد بلکه بیان گیرنده استروژن و پروژسترون را نیز به مخاطره انداخته و ممکن است باعث آسیب تخمدان و اختلال در حاملگی یا تاخیر در بارداری گردد [۷].

به دنبال استرس با تشدید فعالیت محور HPA، ترشح بیش از حد گلوکوکورتیکوئیدها اتفاق می‌افتد که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو سلولی می‌شود [۸]. در شرایط استرس اکسیداتیو، سطح بالا و غیرطبیعی ROS، مثل رادیکال‌های آزاد (هیدروکسیل، نیتریت اکسید، سوپراکسید) یا غیر رادیکال (H2O2 و لیپید پراکسید)، می‌توانند به مولکول‌های خاص و اجزای تشکیل‌دهنده‌ی سلول نظیر لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها آسیب وارد کرده و منجر به مرگ سلولی به صورت نکروز و آپوپتوز شوند [۹،۸]. گزارشات نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو می‌تواند بر روی باروری خانم‌ها و سلامت گامت دارای اثرات منفی مهمی باشد و مداخلات دارویی یا تغذیه‌ای ممکن است به عنوان یک استراتژی موثر، باروری خانم‌ها را از اثرات منفی ROS و استرس اکسیداتیو حفظ نماید [۷].

پروپولیس (بره موم) یک محصول طبیعی صمغی شکل از رزین‌های گیاهی است که از جوانه‌ها، برگ‌ها و دیگر بخش‌های گیاهانی مثل سپیدار، کاج، صنوبر و ... ترشح شده و توسط زنبور عسل جمع‌آوری می‌گردد، سپس زنبورها به آن موم و دیگر ترشحات خود را اضافه می‌کنند. مطالعات بسیاری فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی شامل اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروپولیس را تأیید کرده‌اند [۱۱،۸،۱۰].

پروپولیس یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد به‌طوری‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده عصاره‌ی پروپولیس در واحدهای ORAC (ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن) ۴ برابر بیش‌تر از ویتامین E می‌باشد [۱۲]. این اثرات عمدتاً به علت غلظت بالای پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد که مهم‌ترین ترکیبات فعال دارویی و آنتی‌اکسیدانی در پروپولیس هستند. از آن‌جائی‌که بسیاری از ناهنجاری‌های زمان بلوغ و بزرگ‌سالی ناشی از استرس‌های مختلفی است که در دوران جنینی و نوزادی روی می‌دهند. بنابراین یافتن ترکیباتی که بتوانند اثرات مخرب این استرس‌ها را بر بافت‌های مختلف بدن از جمله تخمدان مهار نمایند، اهمیت فوق‌العاده زیادی پیدا می‌کند. با توجه به نقش تعیین‌کننده و حیاتی تخمدان در باروری و هم‌چنین خواص آنتی‌اکسیدانی پروپولیس، هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثرات حفاظتی عصاره‌ی هیدروالکلی پروپولیس ایرانی بر

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات ساختاری و تکاملی تخمدان نوزادان موش صحرایی ناشی از استرس محدودیت حرکتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه در این مطالعه، از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار با سن ۱۵ روز و وزن تقریبی ۵±۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۵۵-۴۵٪، دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دسترسی کافی و آزاد به آب و غذا در حیوان‌خانه گروه علوم تشریح نگه‌داری شدند. تمام مراحل کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

برای انجام این مطالعه، تعداد ۴۸ سر موش صحرایی ماده به‌طور تصادفی به شش گروه هشت‌تایی به‌صورت زیر تقسیم شدند. تمام آزمایش‌ها از روز ۱۵ بعد از تولد شروع و در روز ۲۱ بعد از تولد پایان یافتند.

گروه اول (کنترل منفی)، که شامل نوزادان ۲۱ روزه بدون هر گونه مداخله می‌باشند.

گروه دوم (کنترل مثبت)، شامل نوزادان ۱۵ روزه‌ای که در طی دوره کنار مادرشان بودند و روزانه ۰/۱ میلی‌لیتر محلول سالین دریافت کردند.

گروه سوم (گروه استرس)، شامل نوزادان ۱۵ روزه‌ای که در طی دوره روزانه شش ساعت از مادرشان جدا بودند.

گروه چهارم، گروه تحت استرسی که روزانه ۵۰ mg/kg عصاره پروپولیس دریافت کردند.

گروه پنجم، گروه تحت استرسی که روزانه ۱۰۰ mg/kg عصاره پروپولیس دریافت کردند.

گروه ششم، گروه تحت استرسی که روزانه ۲۰۰ mg/kg عصاره پروپولیس دریافت کردند.

حیوانات در چهار گروه آخر بعد از جدا شدن از مادر در قفس‌های جداگانه با بستر مناسب نگه‌داری و تزریقات آن‌ها روزانه و به‌صورت داخل صفاقی انجام شد. به منظور جلوگیری از سازگاری حیوانات، زمان استرس دوری از مادر نوزادان (۶ ساعت) ثابت نبوده بلکه به‌طور تصادفی و در فاز روشنایی (۷ صبح تا ۷ بعد از ظهر) در هر روز متغیر بود (مثلاً به‌صورت دوره‌های ۸ صبح تا ۱۴ بعد از ظهر، ۹ صبح تا ۱۵ بعد از ظهر و به همین ترتیب الی آخر) [۱۳].

نحوه آماده سازی و تزریق عصاره پروپولیس پروپولیس مورد استفاده در این تحقیق از کندوهای زنبور عسل واقع در نواحی شمالی استان سمنان جمع‌آوری شد و پس از تایید مرکز آموزشی علمی کاربردی جهاد کشاورزی استان سمنان و تا زمان عصاره‌گیری در داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. عصاره‌ی آبی- الکلی پروپولیس هر هفته به صورت تازه تهیه گردید. به این ترتیب که ابتدا قطعات بزرگ بره موم به قطعات ریز خرد شده و سپس مقدار ۳۰ گرم از آن در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در یک ظرف دربسته و در دمای ۴۲ °C به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره‌ی ۱، در دمای اتاق فیلتر گردید. عصاره‌ی آماده شده برای تهیه پودر خالص آن در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس عصاره پروپولیس با دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی به حیوانات گروه‌های چهارم، پنجم و ششم به صورت روزانه و به مدت هفت روز (از روز ۱۵ تا ۲۱ بعد از تولد) قبل از اعمال استرس تزریق گردید [۱۴].

اندازه‌گیری سطح کورتیکوسترون خون برای اندازه‌گیری سطح کورتیکوسترون خون از روش الیزا(Elisa) استفاده شد. برای این کار ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، تحت بی‌هوشی کامل حیوانات با دوز ۲۰/۸۰ mg/kg کتامین/زایلازین، خون‌گیری از ناحیه قلب آن‌ها انجام شده و پس از سانتریوفیوژ کردن با ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، سرم به‌دست آمده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد و سپس سطح کورتیکوسترون خون با استفاده از کیت الیزا (Corticosterone, ELISA, DRG, Marburg, Germany) اندازه‌گیری گردید. حساسیت این کیت ۰/۳۹ نانوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد [۱۵].

www.SID.ir

Archive of SID

روش هیستومورفومتری اووسیت و انواع فولیکول‌های تخمدان. به منظور بررسی مورفولوژی و شمارش تعداد اووسیت و انواع فولیکول‌های تخمدان، پس از انجام خونگیری تخمدان‌ها از بدن حیوان خارج و وزن آن‌ها تعیین گردید. سپس تخمدان‌ها جهت ثابت‌سازی و انجام مطالعات هیستومورفومتریک به فیکساتیو بوئن و محلول فرمالدئید بافری ۱۰٪ منتقل شدند. در مرحله بعد پس از شستشوی نمونه‌ها با سالین با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون مراحل پردازش بافتی انجام شد و برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید و با روش‌های پریودیک اسید شیف (PAS) و هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند.

انواع مختلف فولیکول‌ها بر اساس تقسیم‌بندی روش پدرسون (Pederson) و پیترز (Peters) شناسایی و طبقه‌بندی شدند. به این ترتیب که با استفاده از میکروسکوپ نوری (مدل زایس آلمان) مجهز به گراتیکول مدرج و متصل به کامپیوتر حاوی نرم‌افزار آنالیز مورفومتریک تصاویر بافت‌شناسی (Motic Images China Group Co., LTD)، فولیکول‌های بدوی از هر ۴ برش و فولیکول‌های اولیه نیز از هر ۶ برش در یک برش تخمدان شمارش شدند و به این ترتیب از شمارش تکراری فولیکول‌ها در برش‌های دیگر جلوگیری گردید [۱۷،۱۶]. فولیکول های آترتیک نیز مطابق با روش مورفولوژیک شرح داده شده توسط Greenwald و با استفاده از همان میکروسکوپ مورد شناسایی و شمارش قرار گرفتند [۱۸].

آنالیز آماری در این تحقیق تمامی داده‌ها به‌صورت mean±SEM ارائه شدند. داده‌های حاصل در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی Tukey توسط نرم‌افزار SPSS، Version 20، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر استرس پس از تولد و عصاره پروپولیس ایرانی بر وزن بدن و وزن تخمدان نوزادان: میانگین وزن بدن نوزادن و هم‌چنین درصد افزایش وزن بدن آن‌ها در گروه استرس به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه سالم و کنترل بود. درمان با عصاره پروپولیس با دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ باعث افزایش معنی‌دار وزن بدن نوزادان گردید (جدول ۱). میانگین وزن تخمدان نیز در گروه‌های تحت استرس به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های سالم و کنترل کاهش یافته بود. استفاده از عصاره پروپولیس با دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ از کاهش وزن تخمدان در نوزادان تحت استرس جلوگیری نموده و باعث افزایش معنی‌دار آن گردید (جدول ۱).

جدول ۱. اثر استرس پس از تولد (استرس دوری از مادر) و عصاره پروپولیس ایرانی بر وزن حیوان، درصد افزایش وزن بدن نسبت به وزن اولیه و وزن تخمدان نوزادان موش صحرایی

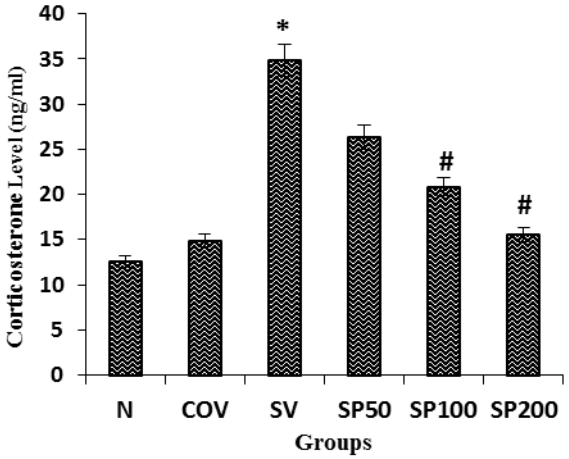
متغیرها / گروه‌ها	وزن حیوان (گرم)	درصد افزایش وزن حیوان نسبت به وزن اولیه (گرم)	وزن تخمدان (میلی گرم)
سالم	#۴۲/۶۳±۱/۹۲	#۵۸/۵۹±۵/۲۳	# ۱۷/۸۷±۰/۷۵
کنترل+سالین	#۴۱/۳۵±۲/۴۵	#۴۷/۶۲±۵/۲۳	۱۶/۸۵±۰/۸۴
استرس+سالین	۳۴/۱۴±۳/۱۳	۱۸/۴۵±۱/۸۴	۱۱/۸۵±۰/۶۹
استرس+پروپولیس ۵۰	۳۸/۵۷±۲/۲۳	*۳۷/۷۵±۶/۵۳	۱۶/۱۵±۱/۰۶
استرس+پروپولیس ۱۰۰	*۴۵/۱۷±۲/۱۴	*۶۴/۵۷±۶/۳۳	&۱۷/۰۷±۰/۵۷
استرس+پروپولیس ۲۰۰	*۴۱/۱۶±۳/۶۵	*۷۵/۰۸±۴/۸۲	*۱۸/۳۵±۰/۷۶

#: تفاوت بین گروههای کنترل و استرس+سالین در سطح $P<0/01$ معنی دار است. *: تفاوت بین گروههای تحت درمان با پروپولیس و استرس+سالین در سطح $P<0/001$ معنی دار است. &: تفاوت بین گروه تحت درمان با پروپولیس و استرس+سالین در سطح $P<0/05$ معنی دار است.

www.SID.ir

Archive of SID

اثر استرس و عصاره پروپولیس ... سطح سرمی کورتیکوسترون سطح سرمی کورتیکوسترون در گروه استرس بسیار بیش‌تر از گروه‌های سالم و کنترل بود. در نوزادان تحت استرسی که عصاره پروپولیس را با دوزهای mg/kg ۱۰۰ و ۲۰۰ دریافت کرده بودند سطح کورتیکوسترون کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۰۱) (شکل ۱).

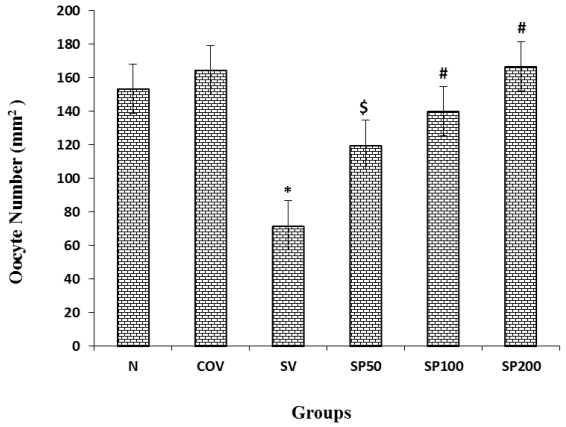


شکل ۱. اثر پروپولیس بر سطح سرمی کورتیکوسترون (نانوگرم/میلی لیتر) نوزادان موش های صحرایی تحت استرس دوری از مادر. داده ها به صورت Mean ± SEM ارائه شده است.گروه سالم(N)، گروه کنترل+ تزریق سالین (COV)، گروه استرس+ تزریق سالین (SV)، گروه استرس+ عصاره پروپولیس 50 mg/kg (SP50)، گروه استرس+ عصاره پروپولیس 100 mg/kg (SP100) و گروه استرس+ عصاره پروپولیس (SP200) 200 mg/kg. *: اختلاف معنی داری در سطح p<۰/۰۰۱ بین گروه های سالم، کنترل و استرس، #: اختلاف معنی داری در سطح p<۰/۰۰۱ بین گروه های پروپولیس ۱۰۰و۲۰۰ با گروه استرس، (n=۸).

اثر استرس و عصاره پروپولیس ... تعداد اووسیت میانگین تعداد اووسیت در گروه تحت استرس به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های سالم، کنترل و تحت درمان با پروپولیس کاهش یافته بود. درمان نوزادان تحت استرس با عصاره پروپولیس به‌ویژه دوزهای mg/kg ۱۰۰ و۲۰۰ به طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد اووسیت گردید (p<۰/۰۰۱) (شکل ۲ و ۳).

اثر استرس و عصاره پروپولیس ... تعداد فولیکول‌های بدوی و اولیه تخمدانی نوزادان میانگین تعداد فولیکول‌های بدوی و اولیه به‌طور معنی‌داری در نوزادان تحت استرس کم‌تر از گروه‌های سالم، کنترل و تحت درمان با عصاره پروپولیس بود. درمان با عصاره هیدروالکلی پروپولیس باعث افزایش تعداد انواع فولیکول‌ها گردید که این افزایش عمدتاً در گروه تحت درمان با دوزهای mg/kg ۱۰۰ و ۲۰۰ از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۱) (جدول ۲ و شکل ۳).

اثر استرس و عصاره پروپولیس ... تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدان میانگین تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدان به طور معنی‌داری در نوزادان تحت استرس بالاتر از گروه‌های سالم، کنترل و تحت درمان با عصاره پروپولیس بود. درمان با عصاره هیدروالکلی پروپولیس باعث کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک گردید که این کاهش عمدتاً در گروه تحت درمان با دوزهای mg/kg ۱۰۰ و ۲۰۰ از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۱) (جدول ۲ و شکل ۱).



شکل ۲. اثر پروپولیس بر تعداد اووسیت (در ۰/۰۲۲ میلیمتر مربع سطح تخمدان) نوزادان موش های صحرایی تحت استرس دوری از مادر. داده ها به صورت Mean ± SEM ارائه شده است. گروه سالم (N)، گروه کنترل+ تزریق سالین (COV)، گروه استرس+ تزریق سالین (SV)، گروه استرس+ عصاره پروپولیس 50 mg/kg (SP50)، گروه استرس+ عصاره پروپولیس 100 mg/kg (SP100) و گروه استرس+ عصاره پروپولیس (SP200) 200 mg/kg. *: اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۱ بین گروه های کنترل و استرس، #: اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۱ بین گروه های پروپولیس ۱۰۰و۲۰۰ با گروه استرس،$: اختلاف معنی داردر سطح ۰/۰۵ >p بین گروه پروپولیس ۵۰ با گروه استرس،(n=۸).

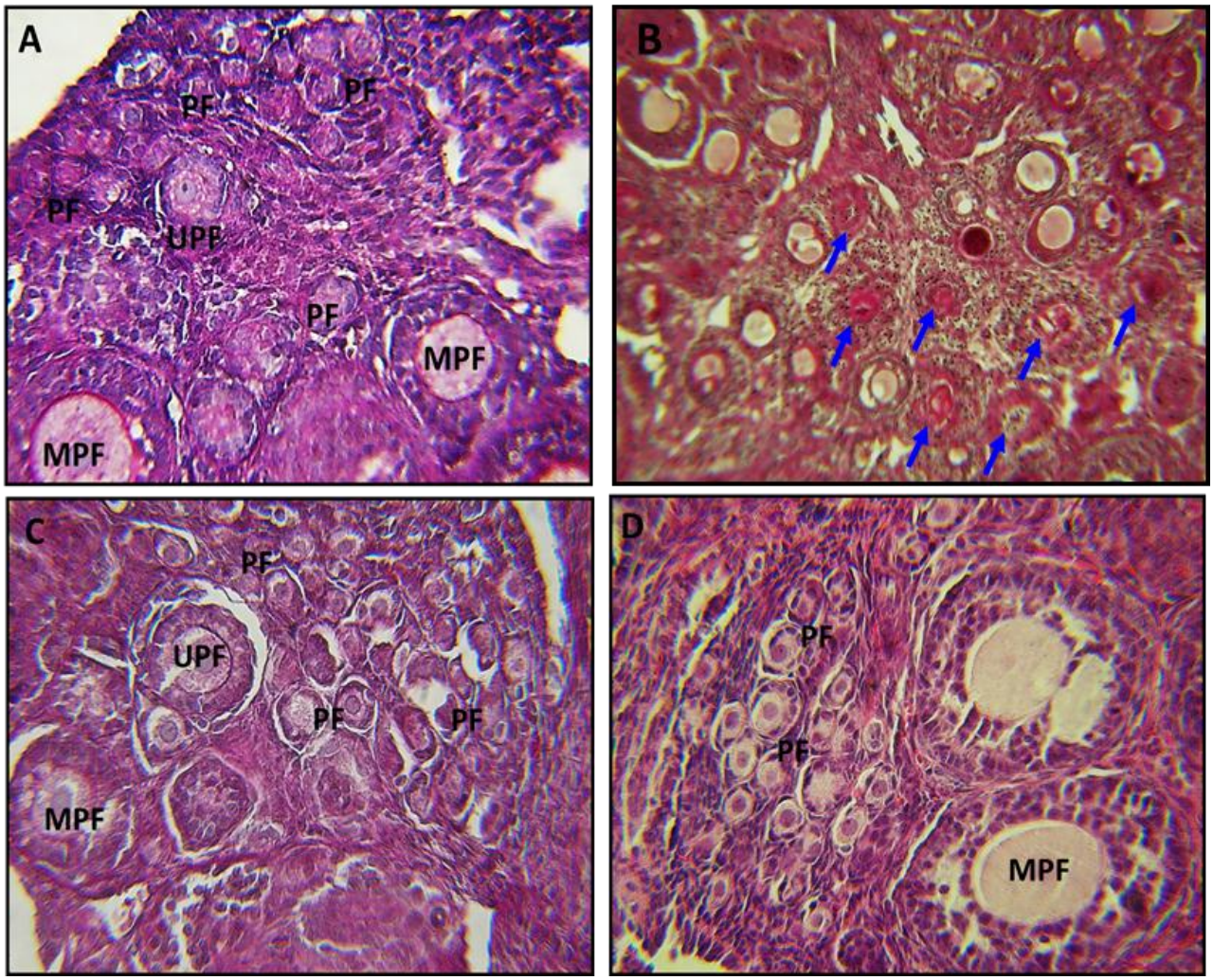
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. اثر استرس پس از تولد (استرس دوری از مادر) و عصاره پروپولیس ایرانی بر تعداد انواع فولیکولهای تخمدانی، تعداد فولیکولهای آترتیک و تعداد اووسیت در واحد سطح تخمدان نوزادان موش صحرایی

متغیرها / گروه‌ها	فولیکول بدوی	فولیکول اولیه	فولیکولهای آترتیک	تعداد اووسیت
سالم	۱۱۹/۷±۷/۰۵	&۴۰/۵±۲/۹۶	* ۱۲/۳±۱/۱۲	#۱۵۳/۲۵±۲۳/۶۳
کنترل+سالین	۱۱۶/۶±۶/۱۵	&۳۸/۷±۵/۶۷	& ۱۱/۲۵±۰/۹۲	*۱۶۴/۲۵±۲۶/۱۹
استرس+سالین	۶۷/۲±۴/۳۸	۱۲±۱/۲۴	۲۱/۴±۰/۸۶	۷۱/۷۵±۱۶/۴۵
استرس+پروپولیس ۵۰	۸۲/۷±۴/۱۸	*۳۱/۸±۴/۹۴	۱۸/۳±۰/۶۷	۱۱۹/۷۵±۱۶/۶۶
استرس+پروپولیس ۱۰۰	#۱۲۰/۸±۷/۵۲	*۳۳/۱±۳/۱۴	# ۱۴/۷۵±۰/۷۴	#۱۴۰±۲۱/۳۲
استرس+پروپولیس ۲۰۰	*۱۲۴/۸±۸/۹۷	&۴۲/۶±۱/۳۳	&۱۱/۷۵±۰/۶۴	*۱۶۶/۷۵±۲۵/۵۶

#: تفاوت بین گروه مورد نظر با گروه استرس در سطح P<۰/۰۵ معنی دار است. *: تفاوت بین گروه مورد نظر با گروه استرس در سطح P<۰/۰۱ معنی دار است.
&: تفاوت بین گروه مورد نظر با گروه استرس در سطح P<۰/۰۰۱ معنی دار است.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ نوری مقطع تخمدان نوزادان ۲۱ روزه موش صحرایی در گروه‌های کنترل (A)، استرس (B)، استرس+پروپولیس ۱۰۰ (C) و استرس+پروپولیس ۲۰۰ (D). انواعی از فولیکول‌های تخمدانی در مقطع تخمدان تمامی گروه‌ها قابل مشاهده می‌باشند. کاهش فولیکول‌های آترتیک در گروه‌های دیگر نسبت به گروه استرس (فلش‌ها) کاملاً مشهود است. (PF) فولیکول‌های بدوی، (UPF) فولیکول اولیه تک لایه، (MPF) فولیکول اولیه چند لایه. بزرگ‌نمایی ×۴۰۰، رنگ آمیزی H&E.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که استرس جدایی از مادر باعث کاهش وزن نوزادان و تخمدان می‌شود و هم‌چنین سطح کورتیکوسترون سرم خون را افزایش می‌دهد و عصاره هیدروالکلی پروپولیس از این تغییرات جلوگیری می‌کند. هم‌چنین استرس جدایی از مادر باعث کاهش تعداد انواع فولیکول‌های تخمدانی و کاهش تعداد اووسیت گردید و استفاده از عصاره پروپولیس ایرانی از این تغییرات جلوگیری کرده و حتی موجب افزایش تعداد انواع فولیکول‌های تخمدانی و تعداد اووسیت گردید. از طرف دیگر یافته‌های ما نشان داد که استرس مزمن دوران نوزادی با تشدید فرآیند آترزی فولیکولی باعث افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک می‌شود و تیمار نوزادان با عصاره پروپولیس از طریق کاهش شدت فرآیند آترزی فولیکولی، باعث کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک گردید. این یافته‌ها نشان می‌دهند که پروپولیس با استفاده از توان بالای آنتی‌اکسیدانی خود، احتمالاً دارای اثرات حفاظتی موثر در برابر تغییرات ساختاری و تکاملی مضر استرس مزمن دوران نوزادی می‌باشد.

افزایش سطح کورتیکوسترون سرم در موش‌های صحرایی جوان به دلیل جدایی از مادر، نشان‌دهنده یکی از شرایط مهم استرس است [۲۰،۱۹]. کاهش معنی‌داری در سطح کورتیکوسترون سرم به دنبال استفاده از عصاره آبی-الکلی پروپولیس ممکن است ناشی از غلظت بالای فلاونوئیدهای آن باشد [۲۱]. Ohno و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که فلاونوئیدها قادرند به‌طور معنی‌داری ترشح کورتیزول را در سلول‌های H295R کاهش دهند و بیان داشتند این عمل ممکن است مربوط به گروه هیدروکسیل در موقعیت ۶ حلقه پیران یا موقعیت ۴ حلقه بنزن فلاونوئیدها باشد [۲۲]. هم‌چنین یافته‌های دیگر حاکی از آن است که در ایزوفلاونون‌ها وجود یک گروه هیدروکسیل یا متیل‌اکسی در موقعیت ۴ حلقه بنزن قادر است تولید کورتیزول را مهار کند. مطالعات دیگر پیشنهاد می‌کنند که پروپولیس می‌تواند از طریق بهبود فعالیت محور HPA باعث کاهش سطح کورتیکوسترون خون گردد [۲۳].

تیمار نوزادان تحت استرس با عصاره هیدروالکلی پروپولیس باعث جلوگیری از کاهش وزن بدن حیوانات در تمام دوزهای مورد استفاده گردید. هم‌چنین دوزهای mg/kg ۱۰۰ و ۲۰۰ پروپولیس به طور معنی‌داری از کاهش وزن تخمدان حیوانات جلوگیری نمود. این اثرات حفاظتی پروپولیس با کاهش سطح کورتیکواسترون هم‌راه بود. یافته‌های قبلی نشان داده‌اند که استرس باعث کاهش گنادوتروپین‌ها شده که به‌عنوان یک فاکتور مهارکننده آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا به شمار می‌روند. بنابراین القاء آپوپتوز توسط استرس و متعاقب آن کاهش تعداد سلول‌های گرانولوزا می‌تواند دلیلی بر کاهش وزن تخمدان باشد. هم‌چنین در مطالعات دیگر مشخص شده است استرس باعث کاهش میتوز در سلول‌های گرانولوزا و تکا در حین رشد فولیکول‌ها می‌گردد که می‌تواند عامل دیگر کاهش وزن تخمدان باشد.

مشاهدات مختلف نشان داده است که در موش‌های صحرایی ماده، تخمدان بلافاصله پس از تولد فقط حاوی اووسیت بوده و فاقد هر نوع فولیکولی می‌باشد و این بدان معنا است که فرآیند رشد و تکامل فولیکولی در موش‌های صحرایی در زمان پس از تولد رخ می‌دهد [۲۴،۱۸]. هم‌چنین مشخص شده است که فولیکول‌های بدوی سه روز پس از تولد تشکیل شده و بلافاصله پس از طی روند رشد و تمایزی خود، منجر به تشکیل فولیکول‌های اولیه می‌شوند [۲۵].

مطالعات ما نشان داد استرس باعث کاهش فولیکول‌های بدوی و اولیه می‌شود که یافته‌های بهات و همکاران در سال ۲۰۱۱ را تایید می‌کند. از طرفی استرس مزمن تعداد فولیکول‌های آترتیک را در تخمدان نوزادان تحت استرس به طور معنی‌داری افزایش داد که در راستای گزارشات دیگران می‌باشد [۲۵،۱۳].

به نظر می‌رسد کاهش فولیکول‌های تخمدانی و افزایش فولیکول‌های آترتیک احتمالاً ناشی از اختلال در ترشح گنادوتروپین‌ها و استروئیدها (۱۷-بتااسترادیول) به دنبال استرس اکسیداتیو ناشی از شرایط استرس مزمن باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه حاضر احتمالاً پروپولیس به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی (قدرت آنتی‌اکسیدانی آن چهار برابر ویتامین E) قادر است از تخریب و آترزی فولیکولی جلوگیری نموده و در نهایت از کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدان نیز محافظت نماید. یافته‌های قبلی نشان داده‌اند، زمانی که ویتامین E و C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در درمان حیوانات تیمار شده با متی‌داتیون (یک ماده عامل پراکسیداسیون لیپیدی در تخمدان و عامل افزایش فولیکول‌های آترتیک) استفاده می‌شود، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک می‌شوند [۲۶].

استرس مزمن با تحریک فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال، تولید و ترشح گنادوتروپین‌های FSH و LH که برای حیات، رشد و تکامل فولیکول‌های تخمدانی و اووسیت لازم و ضروری هستند را کاهش می‌دهد و باعث کاهش کیفیت فولیکول‌های تخمدانی و اووسیت می‌شود [۲۷]. اثر استرس بر روی گناد بزرگسالان ممکن است برگشت‌پذیر باشد اما ممکن است در مراحل اولیه تکامل فولیکولی (در دوران قبل از بلوغ) این اثر غیر قابل برگشت باشد. افزایش و ترشح مزمن هورمون ACTH تکامل فولیکولی و تخمک‌گذاری را مهار می‌کند [۲۸]. بنابراین کاهش در میزان این هورمون‌ها باعث اختلال در فرآیند رشد فولیکولی و بلوغ اووسیت می‌گردد که در نهایت تعداد اووسیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

استرس به عنوان یکی از عواملی که تغییرات شدیدی در سطح هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی (کورتیکواسترون در جوندگان) و استروئیدی ایجاد می‌کند نقش مهمی در افزایش میزان آترزی فولیکولی ایفا می‌کند. با افزایش سطح گلوکوکورتیکوئیدها در حالت استرس، تشکیل رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و به دنبال آن تولید استروئیدهای جنسی کاهش می‌یابد. گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) ممکن است نقش مهمی در بقا و تکامل فولیکول‌های تخمدانی داشته باشند، به طوری که افزایش آن‌ها باعث کاهش سریع و شدید فولیکول‌های بدوی در تخمدان می‌شود. ROS هم‌چنین ممکن است یک نقش مهم در شروع فرآیند آپوپتوز فولیکول‌ها داشته باشد. هم‌چنین کاهش میزان گلوتاتیون (به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان سلولی) باعث تحریک آترزی فولیکولی می‌شود [۲۵،۲۴]. استفاده از عصاره پروپولیس ایرانی در این مطالعه احتمالاً از طریق کاهش سطح کورتیکوستروئیدها و افزایش تولید استروئیدهای تخمدانی باعث کاهش تولید ROS و به دنبال آن کاهش آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا و آترزی فولیکولی شده است.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که پروپولیس می‌تواند با استفاده از اثرات آنتی‌اکسیدانی خود که به احتمال قوی ناشی از ترکیباتی مثل فلاونوئیدها و پلی‌فنل‌ها می‌باشد از اثرات مخرب استرس سایکولوژیک دوری از مادر (در دوران نوزادی) جلوگیری کرده و هم‌چنین تغییرات ساختاری و تکاملی در تخمدان نوزادان موش صحرایی را کاهش دهد. بنابراین بر اساس یافته‌های این مطالعه، می‌توان گفت که پروپولیس با داشتن خواص آنتی‌اکسیدان بسیار قوی احتمالاً می‌تواند به عنوان یک ترکیب با پتانسیل حفاظتی و احتمالاً درمانی در برابر آسیب‌های ناشی از استرس مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرحی می‌باشد که بر اساس تفاهم‌نامه شماره ۲۱۱۶ فی مابین دانشگاه علوم پزشکی سمنان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شده است. بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی دامغان که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارد. هم‌چنین از جناب آقای ابوالفضل عموزاده و سرکار خانم مجیدی که در انجام کارهای آزمایشگاهی این طرح نهایت همکاری را داشته‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

[1] Relier JP. Influence of maternal stress on fetal behavior and brain development. Biol Neonate 2001; 79: 168-171.

[2] Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. Brain Res Rev 2010; 65: 56-79.

[3] Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. Rev Reprod 2000; 5: 105-113.

[4] Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocine prevent the death of rat pheochromyctoma (pc12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alphatocopherol. Neurosci Lett 2004; 362: 61-64.

[5] Wolf OT. HPA axis and memory. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003; 17: 287-299.

[6] McGaugh J, Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. Curr Opin Neurobiol 2002; 12: 205-210.

[7] Chatterjee A, Chatterjee R. How stress affects female reproduction: An overview. Biomed Res 2009; 20: 79-83.

[8] Sato H, Takeyuki T, Sumitani K, Tkastu H, Urano S. Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. J Clin Biochem Nutr 2010; 47: 224-232.

[9] Seven PT, Yilmaz S, Sesdszven I, Kelestemur GT. The effects of propolis in animals exposed oxidative stress: oxidative stress–environmental induction and dietary antioxidants, LushchakVI, InTech 2012; 267-288.

[10] Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pac J Cancer Prev 2006; 7: 22-31.

[11] Arul Selvan K, Prabhu T. Extraction of Propolis from beehives and characterization of its constituents and medicinal properties. Intern J Adv Eng Technol 2010; 11: 50-53.

[12] Bogdanov S. Functional and biological properties of the Bee products. Bee Product Sci 2011; 1-12.

[13] Bhat Manjula S, YajurvediHN. Effects of neonatal stress on ovarian follicular reserve and initial follicular wavesinrats. J Adv lab Res Biol 2011; 2: 175-184.

[14] Ghassemi L, Zabihi M, Mahdavi R, Seyedmajidi M, Akram S, Motallebnejad M. The effect of ethanolic extract of propolis on radiation-induced mucositis in rats. Saudi Med J 2010; 31: 622-626.

[15] Kim JG, Jung HS, Kim KJ, Min SS, Yoon BJ. Basal blood corticosterone level is correlated with susceptibility to chronic restraint stress in mice. Neurosci Lett 2013; 555: 137-142.

[16] Peters H. The Development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinol 1969; 62: 98-116.

[17] Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. J Repord Fertil 1968; 17: 555-557.

[18] Greenwald GS, Roy SK. Follicular development and its control. In the physiology of reproduction. Eds. Knobil, E., and J.D. Neil, Ravan Press, New York. 629-724.

[19] Carr JA, Norris DO. The adrenal gland. In: Endocrine disruption. Biological basis for health effects in wild life and humans. Oxford university press. USA. 2005; 111-134.

[20] McGee EA, Hseuh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 2000; 21: 200-214.

[21] Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S. Effect of flavonoid phytochemical on cortisol production and on activities of steroidogenic enzyme in human adrenocortical H295R cells. J Steroid Biochem Mol Biol 2002; 80: 355-363.

[22 Li YJ, Xuan HZ, Shou QY, Zhan ZG, Lu X, Hu FL. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. Hum Exp Toxicol 2012; 31: 157-165.

[23] Abdel-Mohsein HS, Mahmoud MA, Mahmoud, UT. Influence of propolis on intestinal microflora of ross broilers exposed to hot environment. Adv Animal Vet Sci 2014; 2: 204-211.

[24] Guigon CJ, Mazaud S, Forest MG, Brailly Tabard S, Coudouel N, Marge S. Unaltered development of the initial follicular waves and normal pubertal onset in female rats after neonatal deletion of the follicular waves. Endocrinology 2003; 144: 3651-3662.

[25] Bhat Manjula S, Yajurvedi HN. Stress induced alterations in pre-pubertal ovarian follicular development in rat. J Stress Physiol Biochem 2011; 4: 51-68.

[26] Guney M, Demirin H, Oral B, Ozguner M, Bayhan G, Altuntas I. Ovarian toxicity in rats caused by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. Hum ExpToxicol 2007; 26: 491-498.

[27] Abdullah KH. Effect of stress hormone antagonists on ovarian follicular development in pre-pubertal rat. J Stress Physiol Biochem 2012; 8: 82-98.

[28] Jasprica I, Bojic M, Mornar A, Besic E, Bucan K, Medic-Saric M. Evaluation of antioxidative activity of croatian propolis samples using DPPH· and ABTS·+ Stable free radical assays. Molecules 2007; 12: 1006-1021.

www.SID.ir

Archive of SID

Protective effect of hydro-alcoholic extract of Iranian propolis on the structure of neonatal rat ovary following stress

Atefeh Arabameri (Ms.C)[1], Hamidreza Sameni (Ph.D) [2]*, Ahmadreza Bandegi (Ph.D)[3]
1 - Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences,Islamic Azad University, Damghan, Iran
2 - Research Center of Nervous System Stem Cells and Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.
3 – Research Center of Physiology, and Research Center of Nervous System Stem Cells and Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 20 Feb 2015; Accepted: 7 Dec 2015)

Introduction*:* Stress has various effects on body systems, including the nervous, endocrine, immune, reproductive and other systems, during neonatal life. The aim of this study was to investigate the effect of hydro-alcoholic extract of propolis on structural and evolutional changes in the neonatal rat ovary following weaning stress.

Materials and Methods*:* female rats aged15 days (n = 48), weighing 15-20 g, were divided randomly into six groups of eight. Experiments started from the day 15 - 21 after birth. First group (negative control) included 21 days infants without any intervention, the second group (positive control) included infants received (0.1 ml) of saline solution daily and were not weaned all over the experiment, the third group (stress group) included infants who were separated from their mothers only six hours per day. The fourth, fifth and sixth groups of rats received daily weaning stress in addition to 50, 100 and 200 mg/kg of Propolis extract. 24 hours after the last injection, serum corticosterone levels were measured. The ovaries were removed and fixed. Sections prepared (5 micrometer) and stained by the methods of H&E and PAS. Histomorphometry was performed using a light microscope equipped with image analysis software.

Results*:* Stress increased the newborn blood serum corticosterone levels and decreased the number of ovarian follicles and oocytes and increased the number of atretic ovarian follicles. However, hydro-alcoholic extract of propolis decreased the corticosterone levels in neonatal rat after stress, increased the number of ovarian follicles and oocytes and decreased the number of atretic ovarian follicles in neonatal rat following stress.

Conclusion*:* This study showed that hydro- alcoholic extract of propolis strongly prevents structural changes in the newborn rat ovaries after stress.

Keywords*:* Propolis, Stress, Ovary, Corticosterone, Infant, Rats

* Corresponding author. Tel: +98 23 33654218
hrsameni@gmail.com

www.SID.ir