

به نام خداوند جان و خرد
کزین برتر اندیشه برنگذرد



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده پزشکی

پایان نامه:

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد علوم تشریحی

عنوان:

بررسی اثرات استرس اجتماعی بر میزان شکست DNA اووسیت موش سوری

اساتید راهنما:

دکتر فرزاد رجایی

دکتر یوسف صادقی

اساتید مشاور:

دکتر فرزانه زمان سلطانی

مهندس امیر جوادی

نگارش:

فاطمه صباغ زیارانی

۱۳۸۹ / ۳ / ۱۷

استاد محترم دکتر محمد علی جباری
تسليم كردن

شماره پایان نامه: ۷

سال تحصیلی: ۸۷-۸۸

۱۳۷۹۸۸

تقدیم به پدر و مادر مهربان و صبورم؛

که همواره موفقیت خود را مرهون دعای خیرشان می دانم.

تقدیم به برادران عزیزم؛

که مشوقان همیشگی ام در راه علم آموزی اند.

پس از شکر گزاری به درگاه خداوند متعال، وظیفه خود می دانم از زحمات افرادی که در اجرای کلیه مراحل این پایان نامه اینجانب را یاری فرمودند، تشکر و قدردانی نمایم:

- استاد راهنمای گرامی، جناب آقای دکتر فرزاد رجایی که در دوره کارشناسی ارشد و بخصوص در تمامی مراحل پایان نامه، موفقیت های خویش را مرهون محبت ها و صبر ایشان می دانم.

- استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر یوسف صادقی که در دوره کارشناسی ارشد و در خصوص پایان نامه از راهنمایی های ارزنده ایشان بهره مند شدم.

- سرکار خانم دکتر فرزانه زمان سلطانی که مشاوره این پایان نامه را پذیرفتند و از راهنمایی های ایشان بهره مند شدم.

- جناب آقای مهندس امیر جوادی که مشاوره آماری این پایان نامه را پذیرفتند و از راهنمایی های ایشان بهره مند شدم.

- اساتید محترم گروه علوم تشریح و بافت شناسی که در دوره کارشناسی ارشد از محضر آنها استفاده کردم.

- جناب آقای دکتر سرایی و آقایان علیزاده و خباز که در تهیه مواد طرح و استفاده از تجهیزات مرکز تحقیقات و توسعه دانشگاه با اینجانب همکاری کردند.

- جناب آقای منصوری که در خرید و فراهم کردن تجهیزات و مواد این طرح نهایت همکاری را بعمل آوردند.

- جناب آقای عباسی مسئول محترم اتاق حیوانات که در تدارک قفس ها، غذا و پوشال برای موش ها همکاری نمودند.

- جناب آقای فلاح مسئول محترم کتابخانه دانشکده پزشکی که از مساعدت ایشان برخوردار شدم.

- سرکار خانم حاجی آقایی که در زمینه هیستوتکنیک از مساعدت ایشان برخوردار شدم.

- و از خانم هاجر صادقی، افسانه ولی قزوینی، نسیم برهانی، سمیه علیجانی و همه همکاران و دوستان خوبم

در گروه علوم تشریح که هر یک به گونه ای در انجام این طرح صمیمانه با من همکاری کردند.

فهرست مطالب :

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
	چکیده فارسی
	فصل اول: مقدمه
۱-۱-۱.....	۱-۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع.....
۱-۲-۱.....	۱-۲-۱- کلیات
۳.....	۱-۲-۱- مکانیسم اثر استرس.....
۹.....	۱-۲-۲-۱- ازدحام.....
۹.....	۱-۲-۳-۱- پدیده آپوپتوز.....
۱۵.....	۱-۲-۴-۱- روش های شناسایی سلول های آپوپتوتیک.....
۱۸.....	۱-۳-۱- اهداف و فرضیات.....
۱۹.....	فصل دوم: مروری بر بررسی متون.....
	فصل سوم: مواد و روش ها
	۱-۳-۱- مواد و محلول های مورد نیاز
۳۱.....	۱-۳-۱-۱- مواد و محلول های مورد نیاز برای تحریک تخمک گذاری و جمع آوری اووسیت ها.....
۳۱.....	۱-۳-۲-۱- مواد و محلول های مورد نیاز برای رنگ آمیزی TUNEL.....
	۱-۳-۲-۲- حیوانات، جمع آوری و بررسی های مورفولوژیک تخمک ها
۳۲.....	۱-۳-۲-۱- گروه بندی حیوانات.....
۳۳.....	۱-۳-۲-۲- تحریک تخمک گذاری و جمع آوری تخمک ها.....
۳۴.....	۱-۳-۲-۳- شمارش و نگهداری تخمک ها.....
۳۶.....	۱-۳-۲-۴- جدا کردن سلول های کومولوس.....
۳۷.....	۱-۳-۲-۵- اندازه گیری تخمک ها.....
۳۷.....	۱-۳-۳- رنگ آمیزی TUNEL.....
۳۹.....	۱-۳-۴- روش های آماری.....
	فصل چهارم: یافته ها
۴۰.....	۱-۴-۱- نتایج مربوط به تعداد تخمک های فلاش شده بازای هر موش در سه گروه.....
۴۰.....	۱-۴-۲- نتایج مربوط به اندازه تخمک های فلاش شده در سه گروه.....
۴۱.....	۱-۴-۳- نتایج مربوط به میزان وزن گیری موش ها و وزن تخمدان ها در سه گروه.....

۴-۴- نتایج مربوط به میزان شکست DNA تخمک های فلش شده در گروه های سه گانه..... ۴۲

فصل پنجم: بحث

۱-۵- بحث مربوط به اثر استرس بر تعداد تخمک های فلش شده..... ۴۶

۲-۵- بحث مربوط به اثر استرس بر اندازه تخمک های فلش شده..... ۴۸

۳-۵- بحث مربوط به اثر استرس بر میزان وزن گیری بدن و وزن تخمدان ها..... ۵۱

۴-۵- بحث مربوط به اثر استرس بر میزان شکست DNA تخمک های فلش شده..... ۵۳

۵-۵- نتیجه گیری کلی..... ۶۰

۶-۵- پیشنهادات..... ۶۰

فصل ششم: منابع مورد مطالعه ۶۲

چکیده انگلیسی

فهرست تصاویر

صفحهعنوان

۳۳.....	تصویر شماره ۱.....
۳۴.....	تصویر شماره ۲.....
۳۴.....	تصویر شماره ۳.....
۳۵.....	تصویر شماره ۴.....
۳۵.....	تصویر شماره ۵.....
۳۶.....	تصویر شماره ۶.....
۳۷.....	تصویر شماره ۷.....
۴۳.....	تصویر شماره ۸.....
۴۳.....	تصویر شماره ۹.....
۴۴.....	تصویر شماره ۱۰.....
۴۴.....	تصویر شماره ۱۱.....
۴۵.....	تصویر شماره ۱۲.....
۴۵.....	تصویر شماره ۱۳.....

فهرست جداول :

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۴۰.....	جدول شماره ۱.....
۴۱.....	جدول شماره ۲.....
۴۲.....	جدول شماره ۳.....
۴۲.....	جدول شماره ۴.....

مقدمه: پاسخ های استرسی به صورت تغییراتی در عملکرد بافت ها و ارگان ها آغاز می شوند و واکنش در مقابل عوامل استرس زا باعث به هم خوردن ثبات محیط داخلی بدن می شود. افزایش استرس های اجتماعی بدنال پیشرفت تکنولوژی می تواند عامل بسیار مهمی در ایجاد اختلالات روحی، جسمی و به دنبال آن ناباروری باشد. از آنجایی که افسردگی و اضطراب در زنان شایع تر از مردان می باشد، بنظر می رسد که اثرات استرس بر روی ارگانهای بدن افراد مونث نظیر دستگاه تولید مثل بیشتر مشخص باشد. لذا در مطالعه حاضر اثرات استرس جمعیتی بر میزان شکست DNA تخمک موش سوری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: ۷۰ عدد موش سوری ماده یک ماهه نژاد NMRI به صورت تصادفی به سه گروه تقسیم و وزن شدند. در گروه شاهد ۴ قفس که در هر قفس ۵، در گروه استرس کم ۲ قفس که در هر قفس ۱۰ و در گروه استرس زیاد ۲ قفس که در هر قفس ۱۵ سر موش به مدت یک ماه قرار گرفتند. در هر سه گروه تحریک تخمک گذاری در روز ۲۸ ام از دوره استرس با ۱۰ واحد PMSG و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد hCG انجام شد. پس از وزن کردن، موش ها به روش جابجایی مهره های گردنی بیهوش شدند. در هر سه گروه، لوله های رحمی پس از ۱۵ ساعت از تزریق hCG در زیر لوپ فلاش و تخمک ها جمع آوری شدند. تخمک ها پس از فیکس شدن با پارافرمالدهید ۴٪ و انجام بررسی های مورفولوژیک، به کمک تکنیک TUNEL رنگ آمیزی شدند و در زیر میکروسکوپ فلورسنت از نظر تعداد تخمک های آپوپتوتیک ارزیابی شدند. داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون آنالیز واریانس و کروسکال والیس (Kruskal Wallis) و در سطح معنی داری $p < 0/05$ آنالیز شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که میزان شکست DNA در تخمک های فلاش شده از موش های گروه تحت استرس کم و نیز گروه تحت استرس زیاد در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری داشته است (۰/۲۶۸٪، ۰/۱۲/۹٪).

۰/۲۲/۱؛ $P < ۰/۰۱۱$ و $P < ۰/۰۱۳$ ؛ اما این میزان در گروه تحت استرس زیاد در مقایسه با گروه تحت استرس کم تفاوت معنی داری را نشان نداد. تعداد کل تخمک های فلاش شده در گروه استرس زیاد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشته است ($۵۰ \pm ۱۳/۱۸$ ، $۳۲/۸ \pm ۱۲/۷۷$ و $P < ۰/۰۰۱$) در حالیکه در گروه استرس کم در مقایسه با گروه شاهد و نیز گروه استرس زیاد نسبت به گروه استرس کم اختلاف معنی داری را نشان نداد. اندازه تخمک های فلاش شده در گروه استرس کم و نیز گروه استرس زیاد در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری داشت ($۸۹/۲۹ \pm ۱/۲۲$ ، $۸۱/۸۴ \pm ۶/۴۶$ ، $۸۲/۶۲ \pm ۸/۰۲$ و $P < ۰/۰۰۲$ و $P < ۰/۰۰۱$)؛ اما بین گروه استرس زیاد و استرس کم اختلاف معنی داری را نشان نداد. میانگین وزن گیری موش ها در گروه استرس زیاد در مقایسه با گروه استرس کم کاهش معنی داری را نشان داد ($۷/۳۹ \pm ۳/۱۵$ ، $۹/۸۵ \pm ۲/۹۶$ و $P < ۰/۰۲۴$)، ولی آزمون آماری اختلاف معنی داری را بین گروه استرس کم و شاهد و همچنین گروه استرس زیاد و شاهد نشان نداد. متوسط وزن تخمدان ها در گروه استرس کم در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان داد ($۰/۰۱۵۹ \pm ۰/۰۰۵۲$ ، $۰/۰۱۹۴ \pm ۰/۰۰۵۶$ و $P < ۰/۰۴۵$) همچنین در گروه استرس زیاد نسبت به استرس کم کاهش یافت و این کاهش معنی دار بود ($۰/۰۱۹۴ \pm ۰/۰۰۵۶$ ، $۰/۰۱۶ \pm ۰/۰۰۳۲$ ، $P < ۰/۰۳۵$) اما در گروه استرس زیاد نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان نداد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که استرس ازدحامی می تواند بر تعداد، اندازه و در نهایت میزان آپوپتوز تخمک های موش اثر منفی داشته باشد.

واژگان کلیدی: استرس اجتماعی، اووسیت، شکست DNA، آپوپتوز، TUNEL، موش.

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع

علی رغم گسترش و پیشرفت دانش پزشکی، نازایی و ناباروری یک معضل مهم است و حدود ۱۵-۱۰٪ از زوجها از این مشکل رنج می‌برند. امروزه در اکثر نقاط دنیا و بیمارستانهای تخصصی زنان، مراکز ناباروری دایر شده است این مسئله نشان می‌دهد که علی‌رغم گسترش روز افزون دانش پزشکی هنوز حل معضل ناباروری یک ضرورت است. با وجود تکنیک‌های تخصصی کمک باروری ART^۱ نظیر GIFT^۲، ICSI^۳، IVF^۴، ZIFT^۵ و غیره در ناباروری، درصد موفقیت بسیار محدود و کم است. مطالعات نشان داده‌اند که استرس می‌تواند در بسیاری از اختلالات مانند ناباروری، عدم موفقیت در IVF و سقط جنین موثر باشد (۱). استرس به عنوان آشفتگی روحی یا عاطفی و یا دگرگونی تعریف می‌شود که در پاسخ به اثرات عوامل زیان آور خارجی و همچنین محرک یا موقعیتی که آن را ایجاد می‌کند، رخ می‌دهد (۲ و ۳). نتایج نشان داده است که انواع گوناگونی از محرک‌های آسیب‌رسان می‌توانند آسیب‌های غیرقابل ترمیمی در DNA ایجاد کنند و این حالت به صورت خود به خود، مسیر خودکشی سلولی را فعال می‌نماید (۴). فراگمته شدن DNA از نظر مورفولوژیکی آپوپتوز نامیده می‌شود (۵)، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول از فرآیندهای مهم تکامل طبیعی است و در طول تکامل رویان پستانداران، می‌تواند در حذف سلول‌های غیر طبیعی، آسیب دیده یا نابجا نقش مهمی بازی کند (۶، ۷ و ۸) و این پدیده تحت تاثیر عوامل مختلف می‌تواند دچار تغییر گردد (۹). امروزه از روشی بنام TUNEL^۶ برای رنگ آمیزی سلول‌های آپوپتوتیک بطور رایج استفاده می‌شود در این روش حتی سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز هستند نشان‌دار می‌شوند (۵). گناد‌های ماده بیشترین و مداوم‌ترین آپوپتوز را در زمان تکامل و بلوغ سلول‌های زایا دارند. درک چگونگی وقوع و تنظیم آپوپتوز در تخمدان از لحاظ بیولوژیکی و کلینیکی اهمیت دارد (۱۰). تخمک و اسپرم سالم برای تکثیر پستانداران ضروری است و هر

^۱ Assisted reproductive technologies

^۲ Gamet Intrafallopian Transfer

^۳ Intra-cytoplasmic Sperm Injection

^۴ In vitro fertilization

^۵ Zygote Intrafallopian Transfer

^۶ Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling

عاملی که تولید طبیعی گامت های ماده را مختل کند، تهدید کننده فعالیت تولید مثلی است. عوامل محیطی و کلینیکی که عملکرد گناد ها را به خطر می اندازند، می توانند بر سلول های سوماتیک و زایا و در برخی موارد بر هر دو تاثیر بگذارند و باعث اختلال باروری شوند. ماده های هر گونه بر خلاف نرها، به طور ویژه ای در معرض خطر عوامل سمی هستند چرا که آنها با سلول های زایای غیر قابل جایگزین، متولد می شوند و انتخاب طبیعی بعدی، این ذخیره گرانها را تا زمان بلوغ کم می کند. در انسان، از دست دادن طبیعی اوسیت ها موجب کاهش ذخیره سلول های زایا در دهه پنجم زندگی و سرانجام یائسگی می شود. آسیب هایی از قبیل داروهای ضد سرطانی، مواد شیمیایی صنعتی و یا حتی سیگار کشیدن با شتاب بخشیدن به فرآیند طبیعی از بین رفتن سلول های زایا و منوپوز، اثرات جبران ناپذیر و غم انگیزی بر تخمدان زنان خواهند داشت. مسیر ژنتیکی و بیوشیمیایی حاکم بر آپوپتوز تخمدان در نمونه های حیوانی و انسان به خوبی بررسی شده است و در حیوانات آزمایشگاهی، مطالعه عملکرد طبیعی تخمدان و اثر عوامل سمی بر آن، به درک چگونگی اثر این عوامل بر آپوپتوز سلول های زایا، کمک می کند (۱۱). وضعیت هسته و سیتوپلاسم اوسیت در زمان لقاح، فاکتور مهم و تعیین کننده برنامه تکاملی رویان است (۱۲). بررسی بقاء و آپوپتوز در فولیکولهای تخمدانی می تواند در درمان، کنترل بیماری ها و فرآیند های تولید مثلی موثر واقع شود (۱۳). آشفتگی فیزیولوژیک اوسیت در دوره طولانی تکامل فولیکولی پستانداران (حدود ۸۴ روز از مرحله فولیکول اولیه تا تخمک گذاری در گاو) منجر به تولید اوسیتی با کاهش توان لقاح و پشتیبانی مراحل بعدی تکامل می شود (۱۴ و ۱۵). عوامل استرس زا بسته به مرحله ای از بلوغ، می توانند باعث شتاب دادن و یا به تاخیر انداختن تولید مثل شوند. زمان حوادثی از قبیل بلوغ، آترزی، رشد و تخمک گذاری تحت تاثیر پاسخ های متغیر فیزیولوژیکی به عوامل استرس زا قرار می گیرند (۱۶). افزایش استرس های اجتماعی بدنبال پیشرفت تکنولوژی می تواند عامل بسیار مهمی در ایجاد اختلالات روحی، جسمی و به دنبال آن ناباروری باشد. از آنجایی که افسردگی و اضطراب در زنان شایع تر از مردان می باشد، بنظر می رسد که اثرات استرس بر روی ارگانهای بدن افراد مونث نظیر دستگاه تولید مثل بیشتر

مشخص باشد (۱۷). با اطلاعات ما تاکنون مطالعه ای که اثرات استرس اجتماعی را به صورت ازدحام موش ها بر روی آپوپتوز، تعداد و کیفیت اوسیت موش و حتی انسان نشان دهد، وجود ندارد. از آنجایی که آپوپتوزیس می تواند به عنوان یکی از مکانیسم های آسیب تخمک ها بدنبال استرس مطرح باشد، بررسی تخمک ها از این نظر می تواند منجر به چشم انداز نوینی در درک مکانیسم آسیب وارده به تخمک و بدنبال آن یافتن راه حل مناسب در جلوگیری از وقوع آن شود و لذا در تحقیق حاضر تاثیر استرس های اجتماعی بصورت ازدحام موش ها بر روی فاکتورهای کیفی و کمی اوسیت موش مورد بررسی قرار می گیرد و در صدد هستیم به این سؤال اساسی پاسخ دهیم که آیا استرس می تواند بر این فاکتور ها مؤثر باشد یا نه؟ و در صورت تایید اثرات منفی استرس بر روی اوسیت، استرس می تواند به عنوان عاملی در ناباروری مطرح باشد.

۱-۲- کلیات

۱-۲-۱- مکانیسم اثر استرس

استرس در مغز شروع می شود و بر مغز و سایر نقاط بدن اثر می گذارد. پاسخ های استرسی حاد تطابق و بقا را از طریق پاسخ های عصبی، قلبی عروقی، خودکار، ایمنی و سیستم های متابولیک افزایش می دهند. استرس های مزمن می توانند از طریق همان سیستم هایی که برهم زننده نظم هستند موجب افزایش و برانگیختن پاتوفیزیولوژی شوند (۱۸). پاسخ های استرسی به صورت تغییراتی در عملکرد بافت ها و ارگان ها آغاز می شوند و واکنش در مقابل عوامل استرس زا باعث به هم خوردن ثبات محیط داخلی (homeostasis) بدن می شود. این تغییرات پاسخ های فیزیولوژیکی هستند که ممکن است از نظر میزان یا بزرگی در بین افراد فرق کنند اما از نظر مشخصات کلی روش و عملکرد، مشابه هستند. پاسخ های فیزیولوژیکی بدنبال حوادث استرس زا اتفاق می افتند. اکثر عوامل استرس زا یک آبشار نورواندوکراینی را القاء می کنند که شامل آزاد سازی فوری کاتکول آمین ها و فعال شدن محور هیپوتالامو هیپوفیز فوق کلیوی (HPI)^۷ است. فعال شدن کامل محور HPI بدنبال پاسخ کاتکول آمین به علت نیاز به زمانی برای تحریک عصبی فاکتور نوروپپتیدی آزاد کننده

⁷ Hypothalamic-pituitary-interrenal axis

کورتیکوتروپین (CRF)^۸ تا اندازه ای کند پیش می رود. این فاکتور از هیپوتالاموس منشا می گیرد و سبب سنتز و ترشح هورمون کورتیکوتروپین (CTH)^۹ از هیپوفیز می شود. هورمون اخیر باید از طریق جریان خون به داخل غده فوق کلیه برود تا سنتز و ترشح هورمون های گلوکوکورتیکوئید (کورتیزول) را تحریک کند. همراهی کاتکول آمین ها و گلوکوکورتیکوئیدها پاسخ استرسی ثانویه و ثالثیه را آغاز می کند. پاسخ ثانویه شامل آزاد سازی ذخیره گلیکوژن کبد، بالارفتن سطوح پلاسمایی گلوکز، اثر بر سطوح در گردش اسید های چرب و جلوگیری کلی از سنتز پروتئین است. استرس می تواند به عنوان آنتی آنابولیک باشد. استرس بر بخش های گوناگون سیستم ایمنی اثر می گذارد و اعتقاد بر این است که منجر به ضعیف کردن آن می گردد. از پاسخ های ثالثیه ناشی از پاسخ استرسی اولیه و ثانویه، آسیب به رفتار طبیعی است. استرس های ویژه می توانند سبب اثر ویژه و یا اثراتی که مستقیماً ناشی از آن ها است، شوند. عوامل استرس زای شدید مثال خوبی از عوامل استرس زا که عمل ویژه دارند، است زیرا آنها سیستم فیزیولوژیکی خاص را هدف قرار می دهند. در حقیقت عوامل سمی خاص نمی توانند پاسخ های کلی تری را فعال کنند. شدت، طول مدت و نوع عوامل استرس زا و نیز گونه و مرحله ی بلوغ منجر به پاسخ های کاملاً متفاوت می شود (۱۶). عملکرد اصلی تخمدان پستانداران تولید سلول های زایا (تخمک)، آزاد شدن در زمان و نیز تعداد مناسب و تضمین باروری موفق و همچنین بقاء گونه ها است. تخمدان این کار را از طریق هماهنگی بسیار پیچیده اما نزدیک فعالیت های ساخت و ترشحات سلول های سوماتیک که اکثریت حجم تخمدان را تشکیل می دهند، انجام می دهد. فعالیت سلول های سوماتیک به طور عمده به وسیله پیام های هورمونی بخش قدامی غده هیپوفیز که در اثر عوامل هورمونی هیپوتالاموس و نیز مراکز بالاتر مغزی تولید می شوند، تنظیم می گردد. مغز مسئول دریافت اطلاعات از محیط های داخلی و خارجی است سپس آنها را تلفیق می کند و پیام های هورمونی مناسب را برای عمل به هیپوفیز می فرستد. همچنین شواهدی وجود دارد که بین مغز و تخمدان ها از طریق عصب رسانی ارتباط مستقیم برقرار

^۸ Corticotropin releasing factor^۹ Corticotropic hormone

است که از غده هیپوفیز می گذرد. از محرک های مهم داخلی مغز، تاثیرات هورمون های استروئیدی و غیر استروئیدی هستند که از تخمدان ها ترشح می شود و توسط سیستم گردش خون به مغز می رسد. محرک های محیط خارجی می توانند از طریق همه مسیرهای حسی شامل بینایی، بویایی، شنوایی و لامسه به مغز برسند (۱۹). عملکرد تولید مثلی زنان به کنترل دقیق استروئید سازی تخمدان بستگی دارد که زمینه رشد فولیکول ها، تخمک گذاری و حاملگی را فراهم می کند. تکامل و عملکرد تخمدان مجموعاً به وسیله فاکتورهای رشد داخلی، سیتوکین ها، گونادوتروپین ها و هورمون های استروئیدی و همچنین عوامل خارجی از قبیل تغذیه و محیط تنظیم می شود. برهم زنده های اندوکراین به عنوان دسته ای از عوامل محیطی هستند که می توانند بر باروری زنان از طریق تغییر در تکامل و عملکرد تخمدان به ویژه اثرات استروژنی؛ ضد استروژنی، آندروژنی و ضد آندروژنی موثر باشند. اطلاعات اخیر پیشنهاد می کند که نه تنها قرارگیری در معرض برهم زنده های اندوکراین در جریان دوره تکامل موجب ایجاد اختلالات تولید مثلی در بالغین می شود بلکه همچنین این اختلالات قابل انتقال هستند (۲۰). اثر استرس ها بر عملکرد تخمدان حیوانات بالغ ضد و نقیض است زمانیکه شرایط پر استرس برطرف می شوند عملکرد تولیدمثلی طبیعی از سر گرفته می شود و این نکته زمانیکه استرس در طول مراحل اولیه تکامل جنین بکار می رود صدق نمی کند. بنابراین زمانیکه رت های حامله در مراحل بحرانی خاصی در معرض استرس های شدید قرار می گیرند ناهنجاری های تولیدمثلی و جنسی در فرزندان آنها زمانیکه به دوره بلوغ می رسند آشکار می شود حالیکه به آن سندرم استرس قبل از تولد گفته می شود. این سندرم به صورت ناهنجاری هایی در رفتار تولید مثلی بخصوص در فرزند نر مشخص می شود که به زنگرایی و مردگرایی در مناطقی از مغز که رفتار جنسی را کنترل می کند، معروف است (۲۱). فرزندان ماده ای که در طول حاملگی تحت استرس بودند نسبت به آنهایی که تحت استرس نبودند، میزان حاملگی کمتر، سقط های خود به خودی بیشتر و بارداری های طولانی تری را تجربه می کنند. اگر چه مکانیسم سندرم استرس قبل از تولد به طور یقین اثبات نشده است، پیشنهاد شده است که استرس قبل از تولد می تواند تعادل بین هورمون

های آدرنال و تخمدانی را در مرحله بحرانی تمایز هیپوتالاموس-بهیم-زند و در زمان بلوغ حیوانات باعث عملکرد تولیدمثلی غیرطبیعی گوناگون شود (۲۲). اینکه زنان تا چه اندازه ای در معرض خطر عوامل استرس زا هستند بی شک بستگی به پارامترهایی از قبیل میزان، تناوب و طول مدت قرار گیری (که اندازه گیری دقیق آنها سخت است) خواهد داشت و شاید به مراحل بحرانی تکامل مانند قبل از تولد، قبل از بلوغ نیز وابسته باشد (۱۹). استرس ثبات محیط داخلی بدن (homeostasis) را مختل می کند و می تواند باعث اختلالات گوناگونی گردد. به عنوان مثال انواع گوناگونی از استرس های فیزیولوژیکی و روانشناختی بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنوکورتیکال (HPA)^{۱۰}، محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادی (HPG)^{۱۱}، سیستم سمپاتیک آدرنومدولاری (sympatho-adrenomedullary) و سیستم عصبی سمپاتیک اثر کرده و منجر به تغییراتی در تعدادی از ارگان ها می شود. استرس در ایجاد فشار خون، آرتریواسکلروزیس، دیابت ملیتوس و دیگر بیماری ها در مطالعات کلینیکی و اپیدمیولوژی دخالت دارد. استرس های فیزیولوژیکی سیستم عصبی سمپاتیک را فعال می کند و باعث افزایش میزان گلوکوکورتیکوئیدها، کاتکول آمین ها و آنژیوتانسین II (Ang II) در جریان خون می شوند. افزایش گلوکوکورتیکوئید و Ang II می تواند فشارخون را بالا برد و افزایش کاتکول آمین ها بازده قلبی و مقاومت محیطی را می افزایش دهد. بنابراین استرس باعث اختلالات حاد و مزمن در جریان خون می شود. افزایش فشار خون سبب اختلال خون سازی (hematogeneous) در عروق خونی میکروسکوپی (microvasculature) می شود. بنابراین با کاهش جریان خون می تواند در ایسکمی محیطی مشارکت کند. همچنین پیشنهاد شده است که استرس روحی سبب اختلالات گذرای عروقی در انسان شود. در واقع به خوبی مشخص شده است که استرس فیزیولوژیکی فشار خون را بالا برده و استرس طولانی مدت سبب اختلال در پوست و ارگان های گوناگونی از قبیل تخمدان، کلیه، تیموس و غدد آدرنال می شود (۲۳). عملکردهای تولیدمثلی از قبیل ترشح LH و رفتار جنسی می تواند تحت تاثیر تجربیات پر استرس قرار گیرد. استرس محور

¹⁰ Hypothalamic-pituitary adrenocortical axis

¹¹ Hypothalamic-pituitary-gonadal axis

HPA را فعال می کند و محور HPG را به هم می ریزد و منجر به اثرات مهاری بر فیزیولوژی و رفتار تولید مثلی زنان می شود. اعتقاد بر این است که اثر مهاری استرس بر محور HPG بخصوص در استرس مزمن به طور عمده ناشی از افزایش میزان هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH)¹² و گلوکوکورتیکوئیدها باشد. زنانی که زیاد ورزش می کنند که به عنوان استرس فیزیولوژیکی در نظر گرفته می شود، بسیاری از مشکلات تولیدمثلی را شامل تاخیر در شروع اولین قاعدگی، آمنوره و ناباروری دارند. افزایش ناگهانی گونادوتروپین قبل از تخمک گذاری در پرواستروس یک رویداد کلیدی برای تخمک گذاری است و برای شروع این افزایش ناگهانی و عمل فیدبکی مثبت ترشح استرادیول (E2) به سیگنال های عصبی خاص قبل از تخمک گذاری وابسته است. هورون های استروئیدی تخمدان E2 و پروژسترون (P) در کنار کنترل تخمک گذاری، اثر متعادل کننده عمیقی بر مدار عصبی که رفتار جنسی را در طول سیکل استروس تنظیم می کنند، دارند. رفتار جنسی به افزایش سرمی E2 بدنبال افزایش غلظت P وابسته است. به عبارت دیگر رخدادهای مهم دیگری مانند افزایش ترشح هورمون آزاد کننده LH، افزایش میزان تغییر و تبدیل نورآدرنالین در مناطق هیپوتالاموسی و نیز افزایش Ang II بر افزایش ناگهانی LH در پرواستروس مقدم هستند. اثرات استرس مزمن بر عملکردهای تولیدمثلی مانند ترشح LH به خوبی اثبات شده است. Ang II یکی از هورمون های اصلی استرس، در پلاسما و نیز در سیستم عصبی مرکزی در پاسخ به تحریک استرس افزایش می یابد. استرس تراکم جایگاه های اتصال Ang II را در هسته های پاراونتریکولار هیپوتالاموس و ارگان ساب فورنیکال رت ها و همچنین فعالیت رنین را افزایش می دهد. در واقع بستن گیرنده Ang II و از بین رفتن کامل پاسخ HPA به استرس، به طور قطع نقش Ang II را به عنوان هورمون اصلی استرس تایید می کند. علاوه بر این Ang II در کنترل عملکردهای تولیدمثلی شامل تنظیم ترشح LH، که به خوبی اثبات شده است، دخیل است. به نظر می رسد Ang II رل مهمی را در مکانیسم های دخیل در تخمک گذاری قبل از افزایش ناگهانی LH در پرواستروس بازی می کند و نشان داده شده که

¹² Corticotropin-releasing hormone

درمان با آنتاگونیست گیرنده Ang II (سارالاسین) آزاد شدن LH را کاهش و تخمک گذاری را مهار می کند.

اثر مهاری استرس مزمن بر محور HPG و اثر مهاری نوراپی نفرین بر ترشح LH از طریق تحریک CRH شناخته شده است (۲۴). شواهدی از فعالیت مهاری کورتیزول در ترشح LH در غده هیپوفیز و هیپوتالاموس وجود دارد. فعالیت کورتیزول در سطح مغز و مهار سیستم تولیدمثل رت های نابالغ با کاشت داخل مغزی این هورمون استروئیدی پیشنهاد شده است (۲۵). بنابراین تحریک موثر هورمون اگزوزن آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH)^{۱۳} در غیاب و یا حضور کورتیزول بر آزاد شدن LH خوک هایی که تخمدان آنها برداشته شده است نشان می دهد که هیپوتالاموس به عنوان محل مهار ناشی از کورتیزول است (۲۶). به عبارت دیگر مهار کورتیزول بر اثر القایی GnRH در آزاد سازی LH از سلول های جدا شده هیپوفیزی گاوی، فعالیت مهاری دیگری را در سطح غده هیپوفیز پیشنهاد می کند (۲۷). بسیاری از انواع استرس ها در نتیجه مداخله در عملکرد طبیعی مراکز هیپوتالاموسی کنترل کننده هیپوفیز قدامی اثرات تخریبی بر سیستم اندوکرین دارند. استرس هایی از قبیل ازدحام می توانند تا حدی در بهم خوردن عملکرد سیکل طبیعی تخمدان مداخله کنند و عملکرد غده فوق کلیه را تغییر بدهند (۲۸). زمانیکه کورتیزول به محیط کشت سلول های گرانولوزای رت اضافه شد با دریافت اینکه گلوکوکورتیکوئیدها اثر القایی تولید استروژن بر FSH را مهار می کند، محل دیگری از عمل (فعالیت) مستقیم کورتیزول بر تخمدان پیشنهاد شده است (۲۹). برخی از شواهد پیشنهاد می کنند که استرس با افزایش میزان کورتیکواستروئید موجب مهار ترشح LH و غیر فعال شدن تخمدان می شود. ترشح تونیک LH شامل پالس متناوب به طور زیادی در طول دوره افزایش کورتیزول، کاهش می یابد (۳۰). کاربرد هورمون های آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH)^{۱۴} یا کورتیکواستروئید اگزوزن از افزایش ناگهانی LH قبل از تخمک گذاری جلوگیری و تخمک گذاری را در خوک متوقف می کند (۳۱) و افزایش تونیک LH را بدنبال برداشتن تخمدان در خوکچه مهار می کند (۲۶).

¹³ Gonadotropin-releasing hormone¹⁴ Adrenocorticotropic hormone

۱-۲-۲- ازدحام

ازدحام به صورت افزایش تراکم حیوان در قفس تعریف می شود که عامل موثر و مهمی است (۳۲). افزایش تعداد حیوانات در هر قفس، فاکتور استرسی مهمی است (۳۳). ازدحام موش ها می تواند بعنوان استرس بر روی احساس، اعمال مغزی و فعالیت های نورواندوکرین آنها موثر باشد (۱۸). اگر چه درباره تاثیر شرایط قفس بر سلامت حیوانات آزمایشگاهی اتفاق نظر وجود دارد، اما هنوز اندازه و ازدحام مناسب قفس برای جوندگان آزمایشگاهی بدست نیامده است. طراحی قفس باید به گونه ای باشد تا در آن سلامت حیوانات حفظ شود و به رشد بهینه برسند. تغییرات قفس می تواند اثر مهمی بر حیوانات داشته باشد و همچنین در نتایج آزمایشات، مداخله کند (۳۴). در سال ۲۰۰۷، Foltz و همکاران اعلام کردند که در رفاه حیوانات، باید ازدحام قفس مورد ارزیابی قرار گیرد (۳۵). گروه های بزرگتر در یک جا می توانند منجر به تهاجم، تروما و انتقال بیماری شوند (۳۶). تجمع گاز (۳۷) حرارت و رطوبت (۳۸)، کاهش دریافت و استفاده از غذا (۳۲ و ۳۹) و همچنین مداخله در رشد (۳۲ و ۳۴) همه ناشی از افزایش اندازه و تراکم قفس هستند. فعالیت فیزیکی نیز می تواند در نتیجه عدم تحرک، محدود شود (۳۲ و ۴۰) فعالیت فیزیکی بویژه در سلامتی مهم است زیرا عملکرد سیستم ایمنی را از طریق تغییر در میزان کورتیکواسترون، افزایش می دهد که می تواند عملکرد فاگوسیتی ماکروفاژ را میانجی گری کند (۴۱) به علاوه افزایش اندازه جمعیت می تواند منجر به رفتار رقابتی از قبیل تلاش برای گریز از قفس (در ماده ها) و جویدن میله های قفس و رفتار تهاجمی برای جفت یابی در نرها شود (۴۲). ازدحام همچنین می تواند منجر به کاهش پاسخ هیجانی و افزایش دفع رت ها و نیز افزایش ناگهانی آدرنوکورتیکوتروپین شود (۴۳).

۱-۲-۳- پدیده آپوپتوز

آپوپتوز، اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی شناخته شد و در متون زیست شناسی و پزشکی برای بیان شیوه جداگانه ای از مرگ سلولی برای از دست دادن سلول در بافت های زنده مطرح شد و به خاطر نمای