Investigation of the Effect of Crowding Stress on Mice Oocyte Parameters and Reproductive Organs

Farzad Rajaei [1], Fatemeh Sabbaghziarani[2]

1. Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Diseases, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6890-8846

2. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Diseases, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. (Corresponding Author): saba.ziarani95@gmail.com; f.sabbagh@qums.ac.ir, Tel: +98-28-33336001-5. ORCID ID: 0000-0002-5167-3569

ABSTRACT

Background and Aim: Stress is known to affect many reproductive variables, including gonadotropins and sex steroid levels. Stressors such as crowding can alter the normal function of the ovaries, fallopian tubes, and uterine cycles. In the this study, we investigated the effect of crowding stress on mice oocyte parameters and reproductive organs.

Materials and Methods: Mice were divided into control, low & high- density crowding stress groups, and kept under stres condition for one month. Superovulation was induced in the mice in all groups by pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG). The mice were sacrificed 15 hours after hCG injection. Grade I and IV oocytes were stained with the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method after collection and evaluation. Ovarian, fallopian tubes and uterine horns tissues were evaluated after staining with hematoxylin and eosin (H&E). Data were analyzed by ANOVA. p-value ≤ 0.05 was considered significant.

Results: The number of grade I and the size of grades I and IV oocytes in the high-density crowding stress group were significantly decreased compared to those in the control group. The rate of DNA fragmentation of grade I and IV oocytes in the low and high- density crowding stress groups demonstrated a significant increase compared to that in the control group. The number of monolayer primary follicles and the height of the fallopian tube epithelium significantly decreased in the high- density crowding stress group compared to those in the control group ($p \leq 0.05$).

Conclusion: Crowding as an environmental stress can affect DNA fragmentation by inducing irregularities in follicular and oocyte development.

Keywords: Crowding stress, Oocyte, DNA fragmentation, Ovary, Fallopian tube, Uterine horn

Received: July 29, 2023 **Accepted:** Nov 15, 2023

How to cite the article: Farzad Rajaei, Fatemeh Sabbaghziarani**.** Investigation of the Effect of Crowding Stress on Mice Oocyte Parameters and Reproductive Organs.ŚJKU 2024;29(1):22-33.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و نه / فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۳/۳۳-۲۲

بررسی اثر استرس ازدحامی بر پارامترهای تخمک و اندام‌های تولید مثلی موش سوری

فرزاد رجایی[۱]، فاطمه صباغ زیارانی[۲]

۱- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۸۸۴۶-۶۸۹۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، (نویسنده مسئول) پست الکترونیک:saba.ziarani95@gmail.com، f.sabbagh@qums.ac.ir، تلفن: ۵-۳۳۳۳۶۰۰۱ -۲۸- ۹۸+. کد ارکید: ۳۵۶۹-۵۱۶۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: استرس در بر هم زدن بسیاری از متغیرهای تولید مثلی، از جمله سطوح گنادوتروپین و استروئیدهای جنسی مؤثر است. عوامل استرس‌زا مانند ازدحام می‌توانند عملکرد طبیعی تخمدان، لوله فالوپ و چرخه‌های رحمی را تغییر دهند. در مطالعه حاضر اثر استرس ازدحامی بر پارامترهای تخمک و اندام‌های تولید مثلی موش بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌ها به گروه‌های شاهد، استرس ازدحامی با تراکم کم و زیاد تقسیم و به مدت یک ماه در این شرایط نگهداری شدند. موش ها در همه گروه‌ها با گنادوتروپین سرم مادیان باردار (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG) و گنادوتروپین جفتی انسانی (Human chorionic gonadotropin, hCG) تحریک تخمک گذاری شده و ۱۵ ساعت پس از تزریق hCG کشته شدند. تخمک‌های درجه I و IV پس از جمع‌آوری و ارزیابی، با روش تانل (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) رنگ‌آمیزی شدند. بافت‌های تخمدان، لوله‌های فالوپ و شاخ‌های رحم پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بررسی شدند. از آزمون ANOVA استفاده شد و سطح معنی‌داری p-value ≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تعداد تخمک‌های درجه I و اندازه تخمک‌های درجه I و IV در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت. میزان شکست DNA در تخمک‌های درجه I و IV در گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم کم‌وزیاد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. تعداد فولیکول‌های اولیه تک لایه و ارتفاع اپی‌تلیوم لوله فالوپ در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد ن نسبت به گروه شاهد به طور قابل توجهی کاهش یافت (p≤۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: ازدحام به عنوان یک استرس محیطی می‌تواند از طریق ایجاد بی‌نظمی در رشد فولیکولی و تخمک، بر شکست DNA تأثیر بگذارد.

کلمات کلیدی: استرس ازدحامی، تخمک، شکست DNA، تخمدان، لوله فالوپ، شاخ رحم

وصول مقاله:۱۴۰۲/۵/۷ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۲/۸/۲۳ پذیرش:۱۴۰۲/۸/۲۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

مقدمه

زنان با تغییرات جامعه، فرهنگ و محیط زندگی، بیشتر از ضعف سلامت روانی فیزیولوژیکی رنج می‌برند(۱). استرس واکنش فیزیکی، عاطفی، رفتاری، روانی و اجتماعی است و زمانی ایجاد می‌شود که فرد تهدیدی (استرسی) را علیه هموستاز خود دریافت کند(۳, ۲). تحقیقات نشان می‌دهد که شلوغی قفس عامل اصلی استرس برای حیوانات است و در ایجاد اختلال در بسیاری از متغیرهای تولید مثلی از جمله سطوح گنادوتروپین، استروئیدهای جنسی و رفتار تولیدمثلی نقش دارد(۴،۵). حیواناتی که گروهی زندگی می‌کنند انواع مختلفی از تعاملات اجتماعی مانند شناخت و حافظه اجتماعی و تعامل با همسالان، رقبا و فرزندان را تجربه می‌کنند؛ اما زندگی گروهی می‌تواند تولیدمثل را مهار کند، خطر عفونت توسط انگل‌ها را افزایش دهد و فشار رقابت برای منابع را تشدید کند. موش‌هایی که ازدحام بیش از حد و مزمن را تجربه می‌کنند، سطح اضطراب بالایی را نشان می‌دهند(۶). علاوه بر این، مطالعات متعدد در انواع گونه‌های جانوری نشان داده‌اند که رفتار تولیدمثلی و فیزیولوژی در پاسخ به افزایش تراکم جمعیت توسط سیگنال‌های غدد درون‌ریز و عصبی کنترل منفی می‌شود. اگرچه این سیستم کنترل به طور کامل شناخته نشده است؛ اما شامل سرکوب آبشار هیپوتالاموس-هیپوفیز-قشر آدرنال (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنوکورتیکال است که در پاسخ به افزایش استرس ناشی از ازدحام فعال می‌شود(۷). فعال شدن محور HPA منجر به ترشح هورمون‌های استرس مختلف مانند گلوکوکورتیکوئیدها (Glucocorticoids, GCs)، هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (Corticotrophin-releasing hormone, CRH) و کورتیزول می‌شود(۸). علاوه بر این، فعالیت شدید محور HPA با فعال‌سازی ناکافی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان که رشد و تکامل فولیکول و تخمک را تنظیم می‌کند، همراه است(۶). کاهش هورمون آزادکننده گنادوتروپین (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) در هیپوتالاموس توسط CRH، کاهش پاسخ گنادوتروپیک به GnRH و به دنبال آن کاهش هورمون لوتئینیزه کننده (luteinizing hormone, LH) در هیپوفیز توسط گلوکوکورتیکوئیدها و در نهایت کاهش سنتز استروئیدهای جنسی می‌تواند محور بیضه یا تخمدان را مهار کند(۶-۴). عوامل استرس‌زا مانند ازدحام عملکرد تخمدان، لوله فالوپ و چرخه‌های رحم را تغییر می‌دهند و موجب چرخه‌های استروس نامنظم، کاهش ذخیره تخمدان، عدم تخمک‌گذاری، آترزی فولیکولی و آپوپتوز می‌شوند. همچنین وجود گیرنده گلوکوکورتیکوئید (Glucocorticoid receptor, GR) در سلول‌های خاصی در بیضه و تخمدان نشان دهنده تأثیر مستقیم استرس بر عملکرد تولیدمثل در سطح غدد جنسی است(۱۱- ۱،۹) و در شرایط ازدحام تعداد فولیکول‌های بدوی و اولیه کاهش می‌یابد(۱). همچنین افزایش مداوم سطح کورتیزول ناشی از ازدحام، رشد و نمو فولیکولی را از بین می‌برد و کیفیت تخمک را بدتر می‌کند(۱۱). مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر ازدحام به عنوان یک استرس محیطی بر پارامترهای تخمک و ارگان‌های تولید مثلی موش سوری طراحی شد.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی حیوانات

مطالعه حاضر از نوع تجربی است. در این مطالعه ۷۰ سر موش سوری ماده NMRI از موسسه رازی (کرج، ایران) خریداری و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دمای ثابت اتاق ۲±۲۲ درجه سلیسیوس، چرخه نور و تاریکی ۱۲:۱۲ و دسترسی آزاد به غذا و آب و قفس با ابعاد ۱۴×۲۱×۲۷ سانتی‌متر) نگهداری شدند. روش‌های آزمایشی پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین تأیید شد. پس از سازگاری حیوانات با شرایط آزمایشگاهی، به طور تصادفی به گروه‌های شاهد با پنج سر موش در هر قفس (در چهار قفس)، استرس ازدحامی با تراکم کم با ده

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

سر موش در هر قفس (در دو قفس) و استرس ازدحامی با تراکم زیاد با پانزده سر موش در هر قفس (در دو قفس) تقسیم و وزن اولیه آن‌ها ثبت شدند. مدت زمان قرار گرفتن در این شرایط یک ماه بود و در همه گروه‌ها وزن حیوانات پس از یک ماه ثبت و سپس از مقادیر قبل از ازدحام کم شد.

جمع‌آوری و بررسی کیفیت تخمک‌ها

تحریک تخمک‌گذاری در روز ۲۸ با ۱۰ واحد (IU) گنادوتروپین سرم مادیان باردار (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG; Folligon, Intervet Co., Holland) و پس از ۴۸ ساعت ۱۰ واحد گنادوتروپین جفتی انسانی (Human chorionic gonadotropin, hCG; Oregon, Intervet Co., Holland) به صورت داخل صفاقی انجام شد. ۱۵ ساعت بعد، موش‌ها پس از اندازه‌گیری وزن، از طریق کشش مهره‌های گردنی کشته و تخمدان‌های هر دو طرف به همراه لوله‌های فالوپ برداشته شدند. سپس تخمدان‌ها با استفاده از میکروسکوپ استریو (Olympus, Japan) از لوله‌های فالوپ جدا و در نهایت وزن شدند. تخمک‌ها از طریق شستشوی لوله فالوپ با PB_1 (Modified phosphate-buffered Saline) جمع‌آوری و سپس در پارافرمالدئید (Merck, Germany) چهار درصد تثبیت شدند.

در همه گروه‌ها پارامترهای تخمک شامل تعداد و کیفیت بررسی شدند. به این صورت که تخمک‌های دارای پنج لایه (بیشتر) از سلول‌های کومولوس و اووپلاسم همگن، به عنوان درجه I (کیفیت بالا) و تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوس (Denuded oocytes) و با اووپلاسم ناهمگن، به عنوان درجه IV (کیفیت پایین) در نظر گرفته شدند(۱۲). تخمک‌هایی که فاقد ویژگی‌های درجه I و IV بودند، تنها در شمارش کلی تخمک‌ها محاسبه شدند. در تخمک‌های درجه I جهت اندازه‌گیری و رنگ‌آمیزی، سلول‌های کومولوس به‌طور مکانیکی با استفاده از پیپتینگ با نوک مناسب جدا شدند. تصویربرداری از تخمک‌های درجه I و IV به صورت تصادفی با استفاده از دوربین نیکون (Coolpix 4500) و اندازه‌گیری آن ها بر حسب میکرومتر با استفاده از نرم‌افزار نیکون انجام شد(Digital Sight DS-L2).

رنگ‌آمیزی TUNEL برای بررسی شکست DNA تخمک

پس از انتخاب تصادفی تخمک‌های درجه I و IV در هر گروه، شکست DNA با استفاده از تکنیک ترکیبی رنگ‌آمیزی هم‌زمان هسته و تانل (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) nick-end labeling, TUNEL; Roche, Germany) بررسی شد(۱۳). برای کنترل مثبت، تخمک‌ها در ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر دئوکسی ریبونوکلئاز (DNase I; Sigma) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۸/۵ درجه سلیسیوس و ۵ درصد CO2انکوبه شدند. برای کنترل منفی، تخمک‌ها در fluorescein-dUTP در غیاب TdT انکوبه شدند.

هسته‌های نشاندار شده در زیر میکروسکوپ فلورسنت (Labomed; USA) مجهز به نور اپی‌فلورسانس بررسی شدند. دو مجموعه فیلتر استاندارد مختلف برای تشخیص ایزوتیوسیانات فلورسئین (FITC) در طول موج انتشار ۵۲۵ نانومتر و پروپیدیوم یدید در طول موج انتشار ۵۶۰ نانومتر استفاده شد و در نهایت در هر گروه تعداد تخمک‌های درجه I و IV دارای شکست DNA شمارش شدند.

بررسی مورفولوژیک بافت تخمدان، لوله فالوپ و شاخ رحم

پس از پردازش بافتی تخمدان‌ها، آمپول لوله-های فالوپ و قسمت میانی شاخ‌های رحم، برش‌های سریالی پنج میکرونی با میکروتوم (Shandon AS 325) از این بافت‌ها تهیه شد. در نهایت از هر نمونه پنج برش (شامل برش های ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ و ۱۷) انتخاب و با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شد. سپس با استفاده از دوربین نیکون (Coolpix 4500) از برش‌ها در زیر میکروسکوپ نوری به طور تصادفی عکس گرفته شد. ارتفاع اپی‌تلیوم اندومتر و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

لوله فالوپ (از سطح قاعده‌ای تا راسی این سلول ها) و اندازه فولیکول اولیه تک لایه (میانگین بزرگترین قطر عرضی و طولی) بر حسب میکرومتر با استفاده از نرم افزار Nikon-Digital Sight DS –L2 اندازه‌گیری شد؛ همچنین تعداد کل فولیکول‌ها، فولیکول‌های اولیه تک لایه و جسم زرد شمارش شدند.

تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، از آزمون‌های ANOVA، Krauskal-Wallis و Fisher استفاده شد. سطح معنی‌داری p-value ≤ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

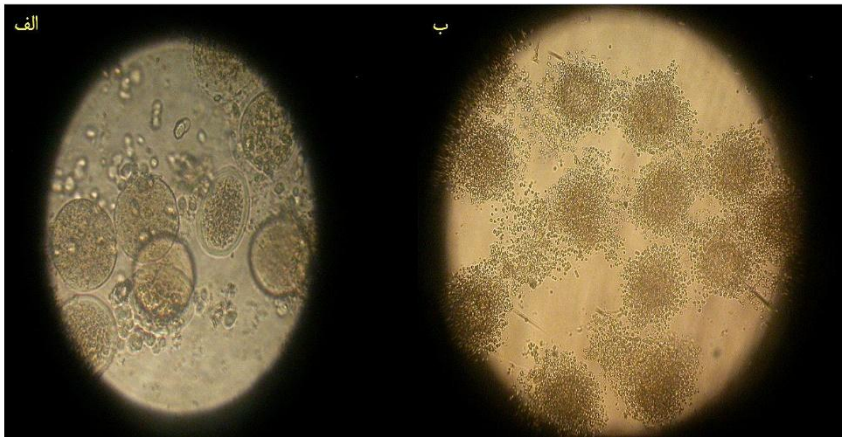
وزن بدن و وزن تخمدان

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین وزن بدن و تخمدان‌ها در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد در مقایسه با گروه های استرس ازدحامی با تراکم کم و شاهد افزایش معنی‌داری داشتند (به ترتیب p<۰/۰۲، p<۰/۰۳ و p<۰/۰۴). در حالی که متغیرهای مذکور در بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم کم و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند(جدول ۱).

بررسی کیفیت تخمک‌ها

در شکل ۱، نمای میکروسکوپی تخمک های درجه I و IV نشان داده شده است. تعداد کل تخمک‌ها و تخمک‌های درجه I در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) داشت. با وجود افزایش تعداد تخمک‌های درجه IV در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد نسبت به گروه شاهد، این افزایش معنی‌دار نبود. همچنین، تفاوت معنی‌داری در تعداد تخمک-های درجه I و IV در بین سایر گروه‌ها مشاهده نشد(جدول ۱).

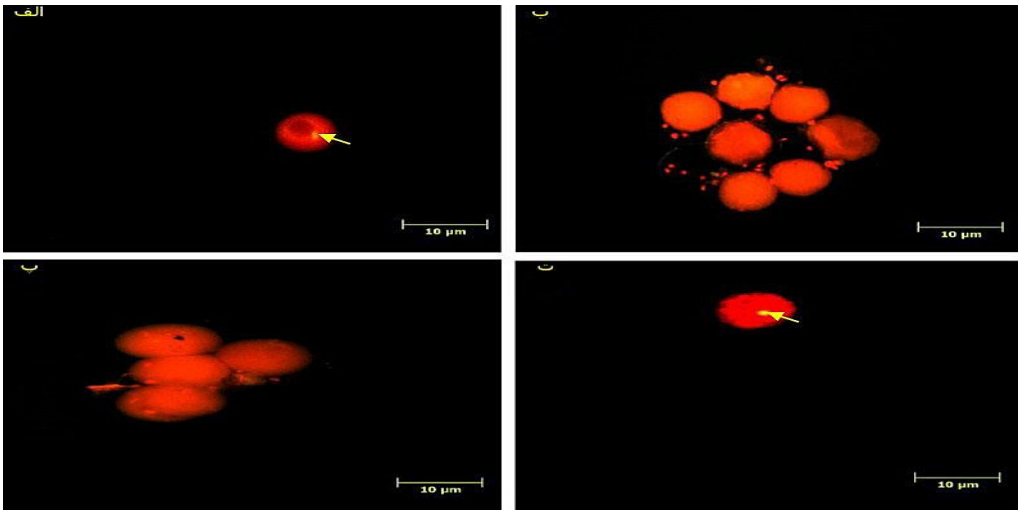
اندازه تخمک‌های درجه I در گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب p<۰/۰۰۲ و p<۰/۰۰۱)، در حالی که بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اندازه تخمک‌های درجه IV در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۳) و تفاوت بین سایر گروه‌ها معنی‌دار نبود(جدول ۲).



شکل ۱. نمای تخمک‌های موش سوری در زیر میکروسکوپ نوری. الف) تخمک‌های درجه IV، بدون سلول‌های کومولوس اووفورس و با اووپلاسم ناهمگن هستند (200X) و ب) تخمک‌های درجه I، با لایه‌های متراکم از سلول‌های کومولوس اووفورس و با اووپلاسم همگن هستند (40X).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]



شکل ۲. نمای تخمک موش سوری در زیر میکروسکوپ فلورسنت. الف) در کنترل مثبت پس از انکوباسیون با DNaseI و رنگ‌آمیزی با TUNEL، شکست DNA به رنگ سبز مایل به زرد مشاهده می‌شود (فلش)، ب) در کنترل منفی تخمک‌ها در غیاب Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)، هیچ یک از سلول‌ها توسط fluorescein-Dutp نشاندار نشده‌اند؛ اما همه با PI رنگ‌آمیزی شده‌اند، پ) تخمک‌های بدون شکست DNA به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند و ت) تخمک دارای شکست DNA به رنگ سبز مایل به زرد مشاهده می‌شود (فلش).

جدول ۱. وزن بدن و تخمدان‌ها و تعداد تخمک‌ها. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. *: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و شاهد، **: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم، NS: تفاوت معنی‌دار نیست.

گروه ها	وزن بدن (گرم)	وزن تخمدان‌ها (گرم)	تعداد کل تخمک‌ها	تعداد تخمک-های درجه I	تعداد تخمک‌های درجه IV
شاهد	۷۷/۷ ± ۲۸/۳	۰/۰۱۵ ± ۰۰۵۲/۰	۵۰ ± ۱۳/۸	۳۹/۴ ± ۹/۵	۵/۶۴ ± ۳/۶
استرس ازدحامی با تراکم کم	۳۹/۷ ± ۱۵/۳	۰/۰۱۶ ± ۰۰۳۲/۰	۴۱/۷ ± ۲۰/۰۲	۳۰/۶۵ ± ۱۴/۹۷	۳/۶۱ ± ۳/۲۷
استرس ازدحامی با تراکم زیاد	۹/۸۵ ± ۲/۹۶	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۵۶	۳۲/۸ ± ۱۲/۷۷	۲۶/۵۳ ± ۱۱/۶۶	۵/۲ ± ۴/۹۱
P-value	*، **p<۰/۰۲	*p<۰/۰۴ ** p<۰/۰۳	*p<۰/۰۰۱	*p<۰/۰۰۱	NS

جدول ۲. اندازه تخمک‌های درجه I و IV. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.
*: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و شاهد، **: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم کم و شاهد، N: تعداد تخمک‌های اندازه‌گیری شده و µm: میکرومتر.

گروه‌ها	تخمک‌های درجه I (µm)	تخمک‌های درجه IV (µm)
شاهد	۸۹/۲۹ ± ۱/۲۲ N = ۲۸۰	۸۸/۴۶ ± ۶/۲۱ N = ۹۸
استرس ازدحامی با تراکم کم	۸۱/۸۴ ± ۶/۴۶ N = ۲۰۰	۸۲/۹۲ ± ۴/۴۵ N = ۷۲
استرس ازدحامی با تراکم زیاد	۸۲/۶۲ ± ۸/۰۲	۸۱/۵۸ ± ۴/۲۹

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

	N = ۱۵۰	N = ۱۰۴
P-value	*p<۰/۰۰۲ **p<۰/۰۰۱	*p<۰/۰۰۳

بررسی شکست DNA تخمک

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تخمک‌های دارای شکست DNA (رنگ زرد-سبز) از آن‌هایی که شکست DNA ندارند (رنگ قرمز)، به‌خوبی مشخص می-شوند. با توجه به جدول ۳ میزان شکست DNA در تخمک‌های درجه I (به ترتیب p<۰/۰۰۸ و p<۰/۰۱) و IV (به ترتیب p<۰/۰۰۵، p<۰/۰۰۱) در گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. میزان شکست DNA در تخمک‌های درجه I بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم معنی‌دار نبود؛ اما این مقایسه در تخمک‌های درجه IV معنی‌دار بود(p<۰/۰۰۴).

بررسی مورفولوژیک بافت تخمدان، لوله فالوپ و شاخ رحم

تعداد فولیکول‌های اولیه تک لایه در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت (P < ۰/۰۰۱) اما تفاوت بین سایر گروه‌ها معنی‌دار نبود. اندازه فولیکول‌های اولیه تک لایه و تعداد کل فولیکول‌ها و جسم زرد در بین هیچ یک از گروه‌های مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

ارتفاع اپی‌تلیوم لوله فالوپ در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد نسبت به استرس ازدحامی با تراکم کم و گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت (P < ۰/۰۰۱)؛ اما ارتفاع اپی‌تلیوم اندومتر در بین هیچ‌کدام از گروه‌های مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشت(جدول ۴).

جدول ۳. شکست DNA در تخمک‌های درجه I و IV. *: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و شاهد. **: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم کم و شاهد، ***: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم و N: تعداد تخمک‌های رنگ‌آمیزی شده.

گروه‌ها	تخمک‌های درجه I	تخمک‌های درجه IV
شاهد	۸ (۹/۱ ٪) N=۸۸	۱۰ (۱۹/۶ ٪) N=۵۱
استرس ازدحامی با تراکم کم	۱۲ (۱۱ ٪) N= ۱۰۹	۱۶ (۳۴ ٪) N= ۴۷
استرس ازدحامی با تراکم زیاد	۲۴ (۲۳/۵ ٪) N= ۱۰۲	۲۱ (۵۲/۵ ٪) N= ۴۰
P-value	*p<۰/۰۱ **p<۰/۰۰۸	*p<۰/۰۰۱ **p<۰/۰۰۵ *** p<۰/۰۰۴

جدول ۴. بررسی مورفولوژیک بافت تخمدان، لوله فالوپ و شاخ رحم .داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. *: تفاوت معنی بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و شاهد، **: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم، N.S: تفاوت معنی‌دار نیست و µm: میکرومتر.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

گروه‌ها	اندازه فولیکول اولیه تک لایه‌ای (µm)	تعداد فولیکول اولیه تک لایه‌ای	تعداد کل فولیکول‌ها	تعداد جسم زرد	ارتفاع اپی‌تلیوم لوله فالوپ (µm)	ارتفاع اپی‌تلیوم اندومتر رحم (µm)
شاهد	۴۳/۰۲ ± ۸/۶۴	۳/۴۸ ± ۱/۱۳	۲۴/۸۹ ± ۶/۸۵	۸/۶۵ ± ۳/۵۵	۳۶/۴۴ ± ۴/۴۴	۲۵/۰۸ ± ۳/۸۵
استرس ازدحامی با تراکم کم	۳۷/۴۸ ± ۷/۲۴	۲/۳۲ ± ۱/۳۴	۲۳/۴۲ ± ۳	۸ ± ۲/۴۳	۳۴/۱۱ ± ۴/۹۱	۲۳/۸۴ ± ۲/۰۳
استرس ازدحامی با تراکم زیاد	۳۷/۵۳ ± ۲/۹۹	۱/۴۴ ± ۱/۰۴	۲۱/۸۴ ± ۶/۰۱	۷/۹ ± ۱/۶۳	۲۷/۳۱ ± ۳/۱۷	۲۳/۳۶ ± ۳/۴۵
P-value	N.S	*p<۰/۰۰۱	N.S	N.S	*, **p<۰/۰۰۱	N.S

بحث

استرس مکرر و طولانی باعث اختلال در تنظیم محور HPA می شود و هموستاز را مختل می‌کند. فعال‌سازی محور HPA منجر به ترشح هورمون‌های استرس مختلف از جمله GCs ، CRH و کورتیزول می‌شود. علاوه بر این، فعالیت بیش از حد HPA با فعال شدن ناکافی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان که رشد و تکوین فولیکول‌های تخمدان و تخمک‌ها را کنترل می‌کند، همراه است(۱، ۶ و ۸). تراکم جمعیت بر تعاملات اجتماعی تأثیر می‌گذارد و نشان داده شده است که ازدحام بیش از حد موش ها باعث افزایش تعاملات اجتماعی و هورمون های استرس می شود(۱).

وزن بدن و وزن تخمدان

با توجه به نتایج مطالعه حاضر وزن بدن و تخمدان‌ها در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد نسبت به گروه استرس ازدحامی با تراکم کم و شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بررسی‌ها نیز نشان می‌دهند که افزایش وزن بدن و تخمدان‌ها در شرایط ازدحام می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت بدنی حیوانات به دلیل نبود فضای کافی باشد(۳). در مقابل نتایج برخی مطالعات تغییراتی از جمله کاهش وزن، کاهش رشد، کاهش جذب غذا و آتروفی تخمدان و بیضه را در حیوانات آزمایشگاهی در شرایط ازدحام نشان می‌دهند(۱۶-۱۴) که می‌تواند ناشی از تغییر در سطح ترشح هورمون‌ها از جمله هورمون رشد(۱۷)، افزایش مصرف انرژی و کاهش مصرف غذا باشد(۱۸). علاوه بر این بر خلاف مطالعه حاضر، برخی محققان هیچ تغییری در وزن بدن در اثر ازدحام مشاهده نکردند(۱۹). به نظر می‌رسد تفاوت نتایج این بررسی‌ها با مطالعه حاضر به دلیل تفاوت شرایط قفس، تراکم جمعیت، طول مطالعه و شرایط فصلی باشد. با این حال، به تحقیقات بیشتری برای درک فرآیندهای اساسی درگیر در اختلال وزن بدن، مصرف انرژی و دریافت غذا ناشی از ازدحام نیاز است.

کیفیت تخمک ها و شکست DNA تخمک

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تعداد کل تخمک‌ها و تخمک‌های درجه I و همچنین اندازه تخمک‌های درجه I و IV، در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل‌توجهی کاهش یافت. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تخمک‌ها پتانسیل بلوغ مرتبط با اندازه دارند و بلوغ هسته‌ای در تخمک‌های بزرگتر به میزان قابل توجهی بالاتر است(۲۰)؛ همچنین استرس مادر کیفیت و کمیت تخمک‌ها را کاهش می‌دهد(۲۱) که علت آن می‌تواند رسوب کورتیزول با منشأ مادری در تخمک‌ها در حوالی دوره ویتلوژنز باشد(۲۲) و این مسئله منجر به کاهش میزان ویتلوژنین و استرادیول در خون، تخمک‌های کمتر و همچنین گامت‌ها و غدد جنسی کوچک‌تر می‌شود(۲۳). این

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

مطالعات می‌توانند کاهش تعداد و اندازه تخمک‌ها را در گروه‌های استرس ازدحامی توجیه کنند.

نتایج ما نشان داد که شکست DNA در تخمک‌های درجه I و IV در گروه‌های استرس ازدحامی با تراکم زیاد و کم در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل توجهی افزایش یافت. در تائید نتایج مطالعه حاضر، تحقیقات نشان می‌دهند که آپوپتوز تخمک می‌تواند ناشی از بی‌نظمی محیط ریز فولیکولی یا کمبود سلول‌های کومولوس باشد(۲۴) و تخمک‌هایی که فاقد سلول‌های گرانولوزا هستند به تدریج تجزیه می‌شوند(۱۲). از طرفی گلوکوکورتیکوئیدها نیز با تحریک آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا از طریق فعال کردن سیستم TNF-α (Tumor necrosis factor alpha) در طول رشد و بلوغ تخمک، کیفیت تخمک را کاهش می‌دهند(۲۵). همچنین استرس در ایجاد اختلال در هموستاز و عدم تعادل در وضعیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارد طوری که گلوکوکورتیکوئید می‌تواند بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) و سیستم‌های آنتی‌اکسیدان محافظ سلولی تأثیر بگذارد. تولید ROS می‌تواند منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در تخمک‌ها شود. استرس اکسیداتیو (Oxidative stress, OS) باعث آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا و در نتیجه کاهش سطح ۱۷ بتا استرادیول، سرعت تخمک‌گذاری و کیفیت تخمک می‌شود. سطح بالای ROS می‌تواند باعث بی‌ثباتی MPF (Maturation or M phase-promoting factor) و کاهش عوامل بقا شود که منجر به آپوپتوز تخمک با واسطه میتوکندری می‌شود. اگرچه OS باعث توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در تخمک‌های نابالغ و بالغ می‌شود؛ اما تخمک‌های نابالغ حساس‌تر هستند و به سرعت در آن‌ها تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوز با واسطه OS از جمله چروکیدگی، حباب‌های غشایی، گرانول‌های سیتوپلاسمی و تحلیل مشاهده می‌شود. مسیر با واسطه کاسپاز میتوکندریایی ناشی از OS، نقش عمده‌ای در حذف سلول‌های زایا از کوهورت تخمدان ایفا می‌کند و کیفیت تخمک را حتی پس از تخمک‌گذاری بدتر می‌کند(۲۱). با توجه به مطالعات فوق به نظر می‌رسد عوامل مختلفی از جمله سیتوکین های التهابی، GCs و OS در ایجاد آپوپتوز تخمک ناشی از ازدحام دخیل باشند که بررسی آن‌ها در شناخت دقیق تر عوامل مؤثر در آسیب DNA کمک کننده خواهد بود.

مورفولوژی بافت تخمدان، لوله فالوپ و شاخ رحم

داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که تعداد فولیکول‌های اولیه تک لایه و ارتفاع اپی‌تلیوم لوله رحم در گروه استرس ازدحامی با تراکم زیاد در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. در تائید نتایج مطالعه حاضر، تحقیقات نشان می‌دهند که عوامل استرس‌زا مانند ازدحام می‌توانند عملکرد طبیعی تخمدان، لوله فالوپ و چرخه‌های رحم را تغییر دهند و وجود GR در سلول‌های خاصی در بیضه و تخمدان نشان دهنده تأثیر مستقیم استرس بر عملکرد تولیدمثل در سطح غدد جنسی است(۱ ،۱۱- ۹). همچنین استرس با کاهش ذخیره تخمدان بر پتانسیل تولید مثل تأثیر منفی می‌گذارد(۱). استرس ناشی از ازدحام سطح GC و هورمون استرس را افزایش می‌دهد و افزایش مداوم سطح کورتیزول، رشد و نمو فولیکولی را از بین می‌برد و کیفیت تخمک را بدتر می‌کند(۱۱). Kim و You در سال ۲۰۲۲ نیز نشان دادند که تعداد فولیکول‌های بدوی و اولیه در شرایط ازدحام کاهش می‌یابد(۱). این کاهش می‌تواند ناشی از افزایش سطح کورتیزول ناشی از عوامل استرس‌زای مختلف باشد که بیوسنتز استروئیدها و ترشح گنادوتروپین را مختل و باعث القا آترزی فولیکولی می‌شود(۹) و می‌تواند به چرخه‌های استروس نامنظم و عدم تخمک‌گذاری در موش‌های تحت استرس منجر شود(۱۰). مکانیسم پیشنهادی دیگر این است که استرس فیزیولوژیکی با سطوح سرمی هورمون ضد مولرین (anti-Muellerian hormone, AMH) که نشانگر پتانسیل تولیدمثلی است، ارتباط منفی دارد و سطوح پایین AMH در شرایط استرس، حذف ذخایر فولیکولی اولیه را تسریع می‌کند که می‌تواند موجب

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

کاهش بیشتر میزان باروری شود. از طرفی افزایش سطح آنژیوتانسینوژن (angiotensinogen, AGT) توسط گلوکوکورتیکوئیدها که تخمک‌گذاری را مختل می‌کند هم نقش اصلی سیستم رنین-آنژیوتانسین تخمدان را در فعالیت چرخه تخمدان مطرح می‌کند. در شرایط ازدحام نیز سطوح آنژیوتانسین II در سرم و تخمدان موش‌ها افزایش می‌یابد که منجر به آپوپتوز سلول‌های فولیکولی می‌شود. همچنین همبستگی منفی بین سطوح AMH و آنژیوتانسین II در سرم ممکن است امکان ایجاد رویکردهای درمانی جدید را برای زنان با کاهش ذخیره تخمدان فراهم کند(۱). از طرفی آنژیوتانسینوژن تحت کنترل هورمون محرک فولیکول (follicle-stimulating hormone, FSH) و از طریق تنظیم فعال‌کننده پلاسمینوژن/مهارکننده فعال‌کننده پلاسمینوژن، در تخمک‌گذاری فولیکول‌های منتخب قبل از تخمک‌گذاری در جوندگان نقش دارد(۲۶) و در تخمدان-های با پاسخ ضعیف با افزایش بیان گیرنده نوع ۲ آنژیوتانسین II (angiotensin II receptor type 2, AGTR2)، بلوغ و کمیت تخمک کاهش می‌یابد(۲۷).

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که استرس ناشی از ازدحام می‌تواند از طریق ایجاد بی‌نظمی در محورهای مختلف سیستم غدد درون ریز از جمله محورهای HPA و HPG (hypothalamic-pituitary-gonadal)، اثرات منفی بر روی چرخه رشد فولیکول‌های تخمدانی به ویژه فولیکول‌های اولیه تک لایه و ارتفاع اپی‌تلیوم لوله رحم داشته باشد؛ همچنین از طریق ایجاد اختلال در چرخه بلوغ تخمک، باعث کاهش کیفیت و افزایش میزان آسیب DNA تخمک شود. بررسی مسیرهای مختلف هورمونی از جمله AMH و سیستم رنین-آنژیوتانسین، ژن‌های دخیل در آپوپتوز، استرس اکسیداتیو و یا سیتوکین های التهابی می‌تواند بینش جدیدی را در درک بهتر زنجیره عوامل دخیل در آسیب به تخمک و در نتیجه جستجوی راه حل مناسب برای جلوگیری از وقوع آن و توسعه مداخلات برای حل مشکلات ناباروری ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد طرح ۲۸/۳۲/۱۰۹۷۲ انجام شده است و هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1. Kim J, You S. High Housing Density-Induced Chronic Stress Diminishes Ovarian Reserve via Granulosa Cell Apoptosis by Angiotensin II Overexpression in Mice. Int J Mol Sci. ۲۰۲۲;۲۳(۱۵):.۸۶۱۴
2. Chukwuebuka NB, Emeka OA, Irikefe OS, Iju WJ, Godsday O, Temitope O, et al. Stress-induced morphological changes of ovarian histology in female Wistar rats. Biomed Pharmacol J. ۲۰۲۰;۱۳(۴):.۴۳-۱۶۲۵
3. Son YL, Ubuka T, Tsutsui K. Regulation of stress response on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-inhibitory hormone. Front Neuroendocrinol. ۲۰۲۲;.۶۴:۱۰۰۹۵۳
4. Díaz Pacheco M, Vargas Romero J, Rojas- Maya S, Retana- Márquez S. Effects of crowding and water restriction stress on creole goat reproduction in the Oaxacan Sierra Mixteca, Mexico. Reprod Domest Anim . ۲۰۱۸;۵۳(۶):.۹۵-۱۳۸۶
5. Ozawa H. Kisspeptin neurons as an integration center of reproductive regulation: Observation of reproductive function based on a new concept of reproductive regulatory nervous system. Reprod Med Biol. ۲۰۲۲;۲۱(۱):e.۱۲۴۱۹

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

6. Lu W, Huang S, Liu J, Batsuren E, Li G, Wan X, et al. Effects of Group Size on Behavior, Reproduction, and mRNA Expression in Brains of Brandt's Voles. Brain Sci. ۲۰۲۳;۱۳(۲):.۳۱۱
7. Suvorov A. Population numbers and reproductive health. Endocrinology. ۲۰۲۱;۱۶۲(۱۱):bqab.۱۵۴
8. Karin O, Raz M, Tendler A, Bar A, Korem Kohanim Y, Milo T, et al. A new model for the HPA axis explains dysregulation of stress hormones on the timescale of weeks. Mol Syst Biol . ۲۰۲۰;۱۶(۷):e.۹۵۱۰
9. Dong Y-z, Zhou F-j, Sun Y-p. Psychological stress is related to a decrease of serum anti-müllerian hormone level in infertile women. Reprod Biol. ۲۰۱۷;۱۵(۱):.۴-۱
10. Pankhurst MW. A putative role for anti-Müllerian hormone (AMH) in optimising ovarian reserve expenditure. J Endocrinol. ۲۰۱۷;۲۳۳(۱):R۱-R.۱۳
11. Whirledge S, Cidlowski JA. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. Endocrinology. ۲۰۱۳;۱۵۴(۱۲):.۶۸-۴۴۵۰
12.Yu X, Li Z, Zhao X, Hua L, Liu S, He C, et al. Anti-Müllerian Hormone Inhibits FSH-Induced Cumulus Oocyte Complex In Vitro Maturation and Cumulus Expansion in Mice. Animals. 2022;12(9):1209.
13. Sadeghi M, Chegini R, Sabbaghziarani F, Soleimani P, Ashtarimajelan M, Zafari F. Investigating the Effect of Atorvastatin on the Rate of Apoptosis in Mouse Oocytes. Cell and Tissue Journal. 2023;13(4):248-56.
14. Shafiei A, Ehteram H, Akbari H, Kashani MM, Beigi M, Mahabadi JA, et al. The effect of chronic noise stress on serum levels of cortisol, gonadotropins, and sexual hormones at implantation time of mice. Comp Clin Path. ۲۰۱۷;.۸۴-۲۶:۷۷۹
15. Calisir M, Yilmaz O, Kolatan HE, Sezgin AK. Effects of litter size and caging on physical and mental development in rats. Physiol. Behav. 2023;267:114200.
16. Love J, Zelikowsky M. Stress Varies Along the Social Density Continuum. Front. Syst. Neurosci. 2020;14.
17. Jalali M, Saki G, Sarkaki AR, Karami K, Nasri S. Effect of noise stress on count, progressive and non-progressive sperm motility, body and genital organ weights of adult male rats. J. Hum. Reprod. Sci. . ۲۰۱۲;۵(۱):.۴۸
18. Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. Endocrinol Metab. ۲۰۱۳;۲۸(۴):.۹۶-۲۸۸
19. Lin EJ, Sun M, Choi EY, Magee D, Stets CW, During MJ. Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. Psychoneuroendocrinology. 2015;51:318-30.
20. Jiang Y, He Y, Pan X, Wang P, Yuan X, Ma B. Advances in Oocyte Maturation In Vivo and In Vitro in Mammals. Int. J. Mol. Sci.. 2023;24(10):9059.
21. Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. J. Biomed. Sci. ۲۰۱۶;.۵-۲۳:۱
22. Jeffrey JD, Gilmour KM. Programming of the hypothalamic-pituitary–interrenal axis by maternal social status in zebrafish (Danio rerio). J. Exp. Biol.. ۲۰۱۶;۲۱۹(۱۱):.۴۳-۱۷۳۴
23. Mileva VR, Gilmour KM, Balshine S. Effects of maternal stress on egg characteristics in a cooperatively breeding fish. Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. ۲۰۱۱;۱۵۸(۱):.۹-۲۲
24. Lu J-H, Wang J-Z, Wang H-L, Sui H-S, Liu Y, Li J-J, et al. Damaging effect of cumulus denudation on rabbit oocytes. Fertil. Steril. ۲۰۱۰;۹۳(۵):.۷۳-۱۵۶۷

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]

25. Yuan H-J, Li Z-B, Zhao X-Y, Sun G-Y, Wang G-L, Zhao Y-Q, et al. Glucocorticoids impair oocyte competence and trigger apoptosis of ovarian cells via activating the TNF-α system. Reproduction. ۲۰۲۰;۱۶۰(۱):.۴۰-۱۲۹
26. Sun L, Lv H, Wei W, Zhang D, Guan Y. Angiotensin-converting enzyme D/I and plasminogen activator inhibitor-۴ ۱G/۵G gene polymorphisms are associated with increased risk of spontaneous abortions in polycystic ovarian syndrome. J. Endocrinol. Invest. ۲۰۱۰;.۸۲-۳۳:۷۷
27. Peña Ó, Palumbo A, González-Fernández R, Hernández J, Naftolin F, Ávila J. Expression of angiotensin II type ۱(AT۱) and angiotensin II type ۲(AT۲) receptors in human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. Fertil. Steril. ۲۰۱۰;۹۳(۵):-۱۶۰۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.61186/sjku.29.1.22]