نقش فیزیولوژیک پینوپودها (گنبدهای رحمی) در انسان

مریم کبیرسلمانی .Ph.D[1]*، حسین نیکزاد .Ph.D[2]، میتسوتوشی ایواشیتا .Ph.D[3]

۱. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
۳. گروه ناباروری – زنان، دانشگاه علوم پزشکی کیورین، توکیو، ژاپن

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۷۷– ۱۹۸۳۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
پست الکترونیک: Email: kabirs_m@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۹/۱، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۱/۱۵

هدف: بررسی نقش ناشناخته پینوپودها (گنبدهای رحمی) در انسان.

مواد و روشها : ۲۳ بیوپسی از آندومتر زنان بارور با سیکل رحمی طبیعی در فاز لوتئال توسط روش‌های ایمونوهیستوشیمی در میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی امکان اگزوسیتوز در برجستگی‌های گنبدی شکل رحمی از مارکرهای اختصاصی اگزوسیتوز شامل: ۱. سین تاکسین- ۱(Syntaxin-1)، اسنپ -۲۵ (SNAP-25) و ومپ -۲ (VAMP-2) استفاده شد. همچنین از رنگ‌آمیزی دوگانه فاکتور مهار کننده لوسمی (Leukemia Inhibitory Factor: LIF) که یکی از مواد شناخته شده است و توسط سلول‌های اپی‌تلیومی رحمی ترشح می‌شود) و یکی از مارکرهای فوق با استفاده از روش‌های ایمونوفلورسنت و ایمونوگلد استفاده شد.

یافته‌ها: در مشاهدات با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ، برای اولین بار حضور فراوان گنبدهای رحمی در دهانه و مجاری غدد رحمی گزارش و برجستگی‌هایی توسط میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن و اسکنینگ مشاهده شد که دارای وزیکول‌های ترشحی در ناحیه راسی خود بودند. پارگی‌هایی نیز در بخش راسی برخی از گنبدهای رحمی قابل مشاهده بود. رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی حاکی از بیان بالای LIF در گنبدهای رحمی و هم مکانی آن با مارکرهای اختصاصی اگزوسیتوز بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از مشاهده مستقیم و روش‌های غیرمستقیم حاکی از آن است که گنبدهای رحمی یا پینوپودها در انسان عملکرد ترشحی دارند و بر خلاف واژه اشتباهی که نامیده می‌شدند (پینوپود: پای آشامنده)، در انسان حداقل به دو روش آپوکرین و اگزوسیتوز نقش ترشحی ایفا می‌کنند. یکی از مواد مهمی که توسط گنبدهای رحمی ترشح می‌شود و بیان بالایی در گنبدهای رحمی دارد LIF است.

کلید واژگان: اگزوسیتوز، پینوپود، ترشح، فاکتور مهار کننده لوسمی، گنبد رحمی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۲۷۵-۲٦٤

مقدمه

اگرچه فرآیند لانه‌گزینی جنین در هر بافتی امکان‌پذیر است اما آندومتر تنها بافتی است که اجازه لانه‌گزینی را به جنین نمی‌دهد؛ مگر در دوره زمانی محدودی از سیکل رحمی موسوم به پنجره لانه‌گزینی (Implantation window). در این دوره، آندومتر دستخوش یک‌سری تغییرات اساسی در غشای پلاسمایی سلول‌های اپی‌تلیومی می‌گردد که تحت عنوان تحولات غشای پلاسمایی (The plasma membrane transformation) خوانده می‌شوند (۲). ظهور برجستگی‌های بزرگ و گردی در بخش راسی سلول‌های اپی‌تلیومی، یکی از بارزترین تحولات غشای پلاسمایی در بسیاری از گونه‌های پستانداران است (۳). برجستگی‌های فوق که تحت عنوان پینوپود نامیده شدند، برای نخستین بار در موش کوچک (۴) و موش بزرگ آزمایشگاهی (۵) گزارش شدند. در ابتدا، نیلسون و همکارانش سعی داشتند که نقش آپوکرین را در این برجستگی‌ها نشان دهند (۶). آنها به زودی جذب مواد الکترون دنس توسط این برجستگی‌ها را گزارش کردند (۷). سپس، واژه یونانی پینوپود به معنای پای آشامنده به این برجستگی‌ها اطلاق شد که در واقع حاکی از عملکرد پینوسیتوزی آنها بود. اخیرا، با توجه به تفاوت‌های متعدد فوق ساختاری و همچنین عملکردی بین این برجستگی‌های رحمی در جوندگان و انسان، پیشنهاد شده است که از واژه عمومی گنبد رحمی (uterodome) به جای پینوپود استفاده شود (۱۰-۸). به لحاظ محدوده زمانی ظهور گنبدهای رحمی که مقارن با بازشدن پنجره لانه گزینی است، موجب شده است مطالعات بسیار وسیعی در خصوص بیومولکول‌های حاضر در سطح گنبدهای رحمی صورت بگیرد و

Archive of SID
www.SID.ir

گزارش‌های متعددی نیز در خصوص ارتباط گنبدهای رحمی با لانه‌گزینی و ناباروری ارائه شده (۱۳-۱۱) که در این میان، وابستگی مستقیم بین ظهور گنبدهای رحمی و بیان عامل مهار کنندهٔ لوسمی (LIF) در آندومتر انسان نیز گزارش شده است (۱۵).

مدارک مستدلی حاکی است اعضای خانوادهٔ سایتوکاین‌ها (Cytokines)، نظیر اینترلوکین۶ (Interleukin-6: IL-6)، نقشی کلیدی در تنظیم فرآیند لانه‌گزینی جنین در انسان دارند (۱۷).

نقش مهم LIF در روند لانه گزینی از زمانی مطرح شد که موش‌های مادهٔ ترانس ژنیک هوموزیگوت که در بیان ژن LIF نقش داشتند، نابارور شدند (۱۸). پس از آن موتاسیون‌هایی در ژن LIF ایجاد کردند و مشخص شد نقص در بیان آن، رابطه مستقیمی با ناباروری دارد (۱۹). در تایید این امر، مشاهده شد که پیامبر LIF RNA در بیوپسی زنان بارور بیان بسیار بالایی دارد (۲۰، ۲۱). همچنین در شرایط *In vitro* و *In vivo* گزارش شده است تولید LIF در زنان نابارور به طور قابل توجهی کمتر از زنان بارور است (۲۳-۲۲). از سوی دیگر، در فقدان LIF مشاهده شده است جنین موش‌های کوچک آزمایشگاهی فقط تا مرحلهٔ بلاستوسیست به صورت طبیعی رشد می‌کنند (۱۹) و با افزودن LIF به محیط کشت جنین‌های انسانی، گزارش شده است تکامل جنین‌ها بهبود می‌یابد (۲۵). تولید LIF به میزان بالایی در لولهٔ فالوپ انسان گزارش شده است (۲۶) که می‌تواند حاکی از اهمیت ویژهٔ آن در مراحل اولیهٔ تکامل جنین انسان باشد.

شکست لانه گزینی از نظر بالینی، عامل عمده عدم موفقیت در لقاح آزمایشگاهی و پایین بودن درصد بارداری است. علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در پزشکی باروری، نقش پذیرش رحمی و عوامل مؤثر بر آن و اهمیت آن در ناباروری همچنان ناشناخته باقی مانده است. از این رو، یکی از ملزومات اولیه در شناخت عوامل و درمان ناباروری، مطالعه و شناخت عوامل مؤثر بر پذیرش رحمی و پنجرهٔ لانه گزینی است.

از آنجایی‌که در شرایط *In vitro* مشاهده شده است گنبدهای رحمی نخستین جایگاه انتخابی برای هم کنشی جنین و آندومتر هستند (۲۷) و در شرایط *In vitro* نیز، این برجستگی‌ها تحت عنوان بیومارکرهای پذیرش رحمی معرفی شده‌اند (۳۰-۲۸)؛ در این تحقیق، عملکرد ناشناخته این تغییرات بارز موررفولوژیک سطح رحم مورد مطالعه قرار گرفته است. از سوی دیگر، با وجود گزارش‌های متعدد در خصوص اهمیت LIF و گنبدهای رحمی در پدیدهٔ لانه گزینی و هم‌زمانی افزایش بیان آنها در زمان باز بودن پنجرهٔ لانه‌گزینی، گزارشی در خصوص هم‌مکانی آنها و نحوهٔ ترشح LIF وجود ندارد. لذا در این تحقیق، علاوه بر بررسی بیان ساب سلولار LIF در سطح سلول‌های اپی‌تلیوم آندومتر انسان، به نحوهٔ ترشح آن از سطح سلول‌های اپی‌تلیوم سطحی و غددی آندومتر نیز پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ نمونه‌های آندومتر

نمونه‌های بیوپسی از جدار قدامی – فوقانی حفرهٔ رحمی ۲۳ زن در مرحله اولیه فاز لوتئال (۵ نفر)، میانی (۱۰ نفر) و اواخر فاز لوتئال (۸ نفر) گرفته شد.

تمام نمونه‌ها از زنان باروری که حداقل یک فرزند زنده به دنیا آورده بودند و سیکل طبیعی داشتند تهیه شد. میانگین سن بیماران ۳۶ سال بود (بین ۴۲-۳۴ سال) و هیچ یک برای حداقل ۳ ماه پیش از نمونه‌برداری از IUD و یا قرص‌های ضدبارداری استفاده نکرده بودند. جهت انجام بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن و اسکنینگ و هم‌چنین رنگ‌آمیزی اختصاصی در میکروسکوپ الکترونی و نوری از هر بیمار دو بیوپسی گرفته شد. یک قطعه در پارافرمالدهاید ۴ درصد (PFA 4%) در ۰/۱ مولار فسفات بافر با pH ۷/۳ برای مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شد. پس از پروسس با سوکروز (Miles, Elkhart, IN, USA) در محلول OCT قالب‌گیری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و به ۸۰- درجه منتقل شد. قطعهٔ دیگر به ۳ قطعهٔ ریز تقسیم شد تا جهت میکروسکوپ SEM، قالب‌گیری در رزین EPON جهت میکروسکوپ TEM استاندارد و قالب‌گیری در رزین LR-white جهت رنگ‌آمیزی ایمنی TEM مورد استفاده قرار گیرد.

از تمامی بیماران رضایت‌نامه جهت جمع‌آوری و استفادهٔ تحقیقاتی از بافت‌های جمع‌آوری شده دریافت شد. این مطالعه توسط کمیتهٔ اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کیورین (توکیو – ژاپن) مورد تایید قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن و اسکنینگ

جهت تهیه نمونه‌ها در میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ، نخست نمونه‌ها در گلوتار آلدهاید ۲/۵درصد فیکس شدند و برای ۱ ساعت در تتراکسید اسمیوم ۱درصد فیکس تکمیلی شدند. سپس، در غلظت‌های پیش رونده اتانول (۱۰۰درصد و ۹۹/۵ و ۹۰ و ۷۰ و ۵۰) آب‌گیری و توسط دستگاه critical-point-drier خشک و پس از مانت شدن با پوششی از طلا توسط دستگاه Sputter coater پوشیده شدند. سپس تمام ۲۳ نمونه از فازهای مختلف مورد مطالعه و مشاهده دقیق توسط میکروسکوپ SEM قرار گرفتند.

جهت تهیه نمونه TEM، نمونه طبق روش فوق فیکس، فیکس تکمیلی و آب‌گیری و در رزین Epon (Epon812, Electron Microscopy Scinces, Frort Washington, PA, USA) قالب‌گیری شد. برش‌های فوق نازک عمود بر اپی‌تلیوم زده شد و با استفاده از سیترات سرب و استات یورانیل رنگ‌آمیزی روتین انجام پذیرفت و تمام نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن بررسی شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

ایمونوهیستوشیمی برای میکروسکوپ نوری

از نمونه‌های بیوپسی که در محلول OCT در دمای ۸۰- درجه نگهداری شده بودند، برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه شد و پس از بلاک رنگ‌آمیزی زمینه توسط سرم آلبومین گاوی ۵ درصد (Bovine Serum Albomin: BSA)، به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق، نمونه‌ها طی شب در دمای ۴درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی مربوطه انکوبه شدند. برای مثال با آنتی‌بادی پلی‌کلونال بز LIF انسانی (Santa Cruz Biotechnology CA USA) و آنتی‌بادی مونوکلونال سین‌تاکسین-۱ (Syntaxin-1) (Santa Cruz)، آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش (Vesicle-Associated Menbrane Protein-2: VAMP-2) از شرکت (Calbiochem Oncogene Research Products, San Diego, MA, USA) و آنتی‌بادی مونوکلونال ۲۵ کیلودالتونی (25-kDa Synaptosomal Protein: SNAP-25) از شرکت (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) که با غلظت نهایی ۱/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق شده بود انکوبه شدند. پس از چندین بار شستشو با PBS حاوی ۰/۰۱ درصد Tween-20(PBST)، آنتی‌بادی‌های اختصاصی باند شدند و توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی ثانویه کونژوگه به مواد فلورسنت ردیابی شدند. بدین منظور، نمونه‌ها در درجه حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه تا ۱ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه خاص خود (Alxa-488 کونژوگه به Donkey anti-goat IgG، Alexa-568 کونژوگه Donkey anti-mouse IgG، CY_2 کونژوگه Dounkey anti-rabbit IgG که همگی از شرکت (Molecular Probes ،Eugene ،OR ،USA) تهیه شده بودند و با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انکوبه شدند. در تمام نمونه‌ها، هسته‌ها توسط رنگ اختصاصی اسیدنوکلئیک (DAPI, 1:1000, Molecular Probes) رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو با PBST نمونه‌ها (با استفاده از گلیسرول ۹۰درصد و بافر Tris-HCl (pH 8.5) حاوی ۰/۵ میکرومتر پی_فنیلین دیامین (P-Phenylene diamine) مانت شدند و توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند. گروه‌های کنترل منفی نیز توسط آنتی بادی‌های ثانویه مشابه گروه‌های آزمایشی یعنی بز، خرگوش و موش کوچک آزمایشگاهی رنگ‌آمیزی شدند. تکرارپذیری آزمایش فوق با ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

ایمونوهیستوشیمی برای میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن

به منظور تهیه نمونه‌ها جهت بررسی ایمونوگلد TEM، نمونه‌های بیوپسی حداقل ۲۴ ساعت تحت دمای ۴درجه سانتی‌گراد در محلول ۴درصد PFA در فسفات بافر ۰/۱مولار (pH 7.4) فیکس شدند. پس از آب‌گیری توسط غلظت‌های بالا رونده اتانول (از ۵۰ درصد تا ۱۰۰درصد)، در رزین (London Resin Company Ltd, London UK) Lowkryle white قالب‌گیری و برش‌های نیمه نازک و فوق نازک آماده شد. پس از شستشوی برش‌ها با PBS و ۳۰ دقیقه انکوباسیون با ۵درصد BSA در دمای آزمایشگاه، با آنتی‌بادی‌های مناسب تحت دمای ۴درجه سانتی‌گراد در طول شب انکوبه شدند. غلظت و نوع آنتی‌بادی‌های اولیه استفاده در این روش نیز نظیر روش آنتی‌بادی‌های مصرف شده در رنگ‌آمیزی فلورسنت بود که قبلا توضیح داده شد.

پس از شستشو با PBS، نمونه‌ها با آنتی‌بادی ثانویه نانوگلد مناسب و تحت دمای ۴درجه سانتی‌گراد در طول شب انکوبه شدند. آنتی‌بادی‌های ثانویه عبارت بودند از: ذرات طلای ۱۸ نانومتری کونژوگه به donkey anti-goat IgG، ذرات طلای ۱۲ نانومتر کونژوگه به donkey anti-mouse IgG که به نسبت ۲۰:۱ در PBS رقیق شده بودند که از شرکت (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., wet Grove, Pa, USA) تهیه شده بودند. سپس، نمونه‌ها با PBS و در نهایت با آب مقطر شستشو داده شدند و با اورانیل استات رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن مشاهده و بررسی شدند. برای گروه‌های کنترل، تمامی مراحل فوق به استثنای انکوباسیون با آنتی‌بادی‌های اولیه انجام پذیرفت. ۶ نمونه به صورت تصادفی در فازهای مختلف (اولیه – میانی و تاخیری لوتئال) به روش فوق جهت تست تکرارپذیری به روش فوق رنگ‌آمیزی شدند.

یافته‌ها

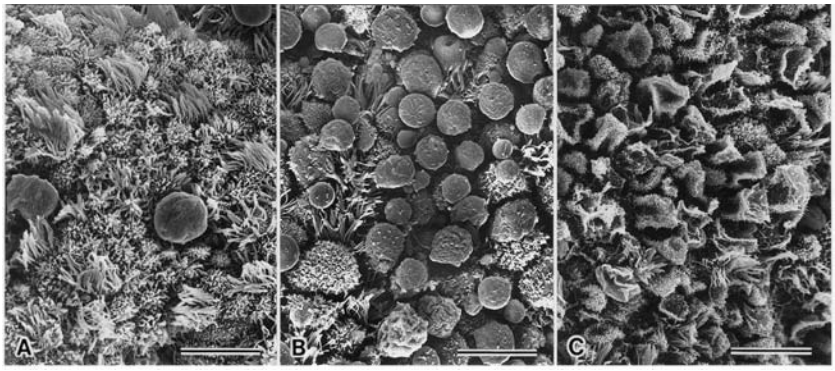
میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ و ترانس میشن

معمولا مشاهدات میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ به تایید حضور گنبدهای رحمی یا پینوپودها و مرحلهٔ تکامل آنها کمک می‌کند. اصولا پینوپودها را بر اساس شکل و مرحلهٔ تکاملی به سه گروه در حال رشد (developing)، تکامل یافته (Fully-developed) و در حال تحلیل (regressing) تقسیم‌بندی می‌کنند (۲۸). در نمونه‌هایی که از مرحلهٔ اولیهٔ فاز لوتئال گرفته شده بود، تعدادی گنبد در حال رشد و تعداد محدود و مجزایی گنبد تکامل یافته دیده می‌شد (شکل ۱A). در مرحلهٔ میدلوتئال که در واقع مقارن با بازشدن پنجره لانه‌گزینی است، گنبدهای تکامل یافته در بیشتر سلول‌های اپی‌تلیالی بدون سیلیا (non-ciliated) در کنار تعداد معدودی گنبدهای رحمی در حال تحلیل دیده شدند (شکل ۱B). در نمونه‌های مربوط به اواخر فاز لوتئال، عمدتا گنبدهای رحمی در حال تحلیل مشاهده می‌شدند (شکل ۱C).

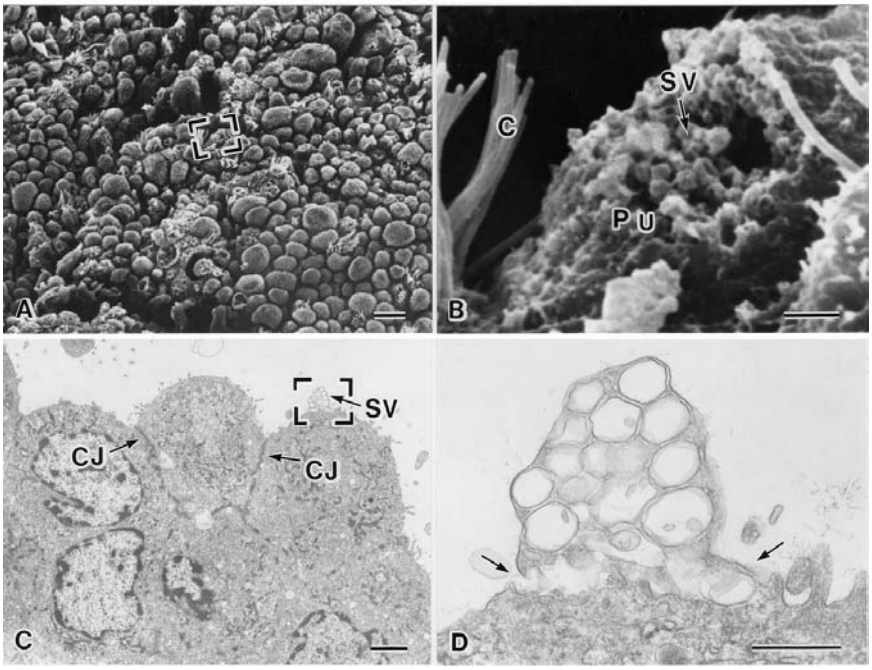
مشاهده دقیق‌تر این نمونه‌ها در بزرگ‌نمایی‌های بالا نشان داد که به ویژه در نمونه‌های مربوط به فاز میدلوتئال و اواخر فاز لوتئال، سوراخ‌هایی در ناحیه راسی این برجستگی‌ها وجود دارد (تصاویر ۲A و ۳A). رها شدن و جدایی برخی وزیکول‌های ترشحی نیز از ورای این سوراخ‌ها قابل مشاهده بود (تصاویر ۲B و ۲D). علاوه بر آن، در برخی از گنبدهای رحمی قطعه بزرگی از غشای پلاسمایی راسی جدا شده بود (تصاویر ۳B، ۳C).

Archive of SID

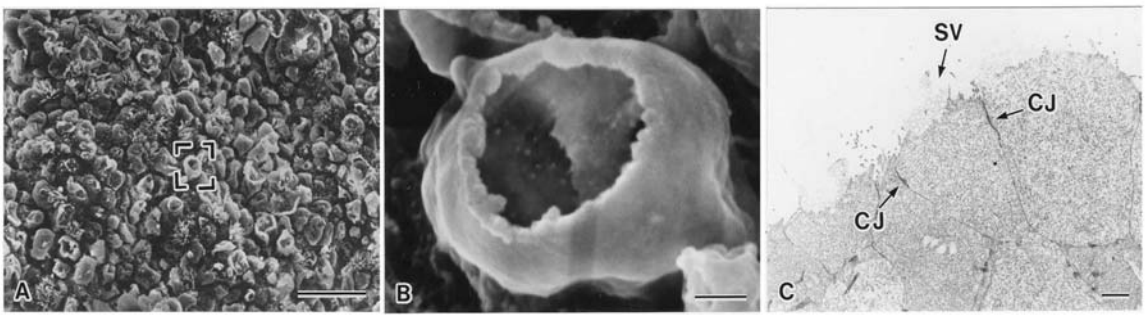
www.SID.ir



شکل ۱: فتومیکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) از بیوپسی اپی‌تلیوم سطحی آندومتر انسان در مراحل: A) مرحلهٔ اولیه فاز لوتئال، (B) مرحلهٔ میانی فاز لوتئال و (C) مرحله انتهایی فاز لوتئال از یک سیکل طبیعی رحمی. Scale bar= ۱۰ میکرومتر

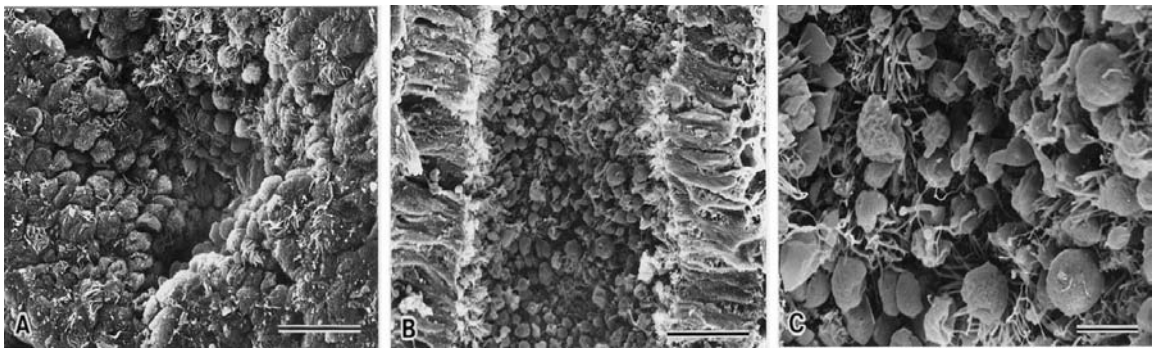


شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) (A و B) و میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن (TEM) (D و C) از بیوپسی‌های آندومتر انسان در فاز میدلوتئال وزیکول‌های ترشحی که سوراخ‌هایی را در ناحیه راسی نشان می‌دهد.
C, Cilia; P(U), Pinopod (Uterodome);
SV, Secretory Vesicle, CJ, Cell Junction.
Scale bars: (A) 20μm, (B) 1μm, (C) 2μm, (D) 0.5μm



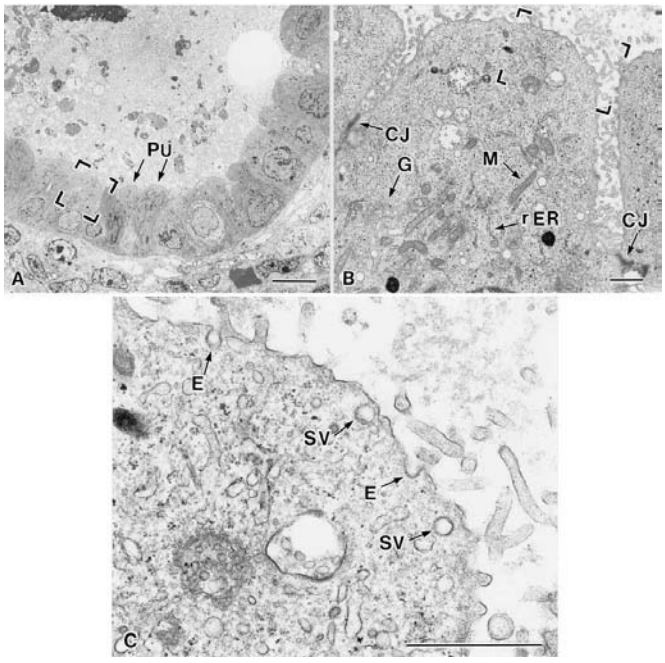
شکل ۳: فتومیکروگراف‌های SEM (B, A) و TEM (C) از بیوپسی‌های آندومتر انسان در فاز انتهایی مرحله لوتئال، پارگی و کندگی‌هایی را در بخش راسی گنبدهای رحمی نشان می‌دهند. در نزدیکی برخی از این پارگی‌های غشا پلاسمایی راسی وزیکول‌های ترشحی مشاهده می‌شوند (C).
SV, Secretory Vesicle; CV, Cell Junction;
Scale bars: (A) 20μm, (B) 1μm, (C) 1μm

www.SID.ir



شکل ۴: فتومیکروگراف‌های SEM از آندومتر انسان در فاز لوتئال از یک سیکل طبیعی رحمی توده‌ای از گنبدهای رحمی را در اطراف دهانهٔ غدد رحمی (A) و پوشش داخلی مجاری آن (B و C) نشان می‌دهد. در پانل A پیشرفت گنبدهای رحمی به داخل غدد کاملا مشخص است. در پانل B و C پس از چندین برش از دیوارهٔ رحمی قبل از پروسس دادن آن، جهت مشاهده با میکروسکوپ SE تعداد کثیری گنبد رحمی در بخش راسی سلول‌های اپی‌تلیوم غدد رویت شد.

Scale bars: (A) 20µm, (B) 20µm, (C) 5µm



شکل ۵: فتومیکروگراف‌های TEM که مقطع عرضی غدد رحمی را نشان می‌دهد و از فاز میدلوتئال بیوپسی آندومتر انسان تهیه شده است. وجود گنبدهای رحمی در بخش راسی سلول‌های اپی‌تلیالی مشهود است. در پانل B برخی ارگانل‌ها غشادار در داخل گنبدهای رحمی قابل مشاهده است. در پانل C، وزیکول‌های ترشحی در فازهای مختلف از ترافیک داخل سلولی و فیوز شدن با غشا سلولی قابل رویت است.

N: Nucleus, M: Mitochonderia, rER: rough Endoplasmic Reticulum, SV: Secretory Vesicle, G: Golgi Complex, E: Exocytosis, CJ: Cell Junction.

در این مشاهدات، علاوه بر آن، گنبدهای رحمی به تعداد زیادی در اطراف دهانهٔ غدد رحمی دیده شوند و به نظر می‌رسید به داخل مجاری نیز کشیده شده‌اند (تصاویر 4B و 4C). در فتومیکروگراف‌هایی که از رنگ‌آمیزی روتین میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن تهیه شده بود نیز گنبدهای رحمی متعددی در ناحیه راسی سلول‌های اپی‌تلیومی غدد رحمی مشاهده شد (شکل 5A).

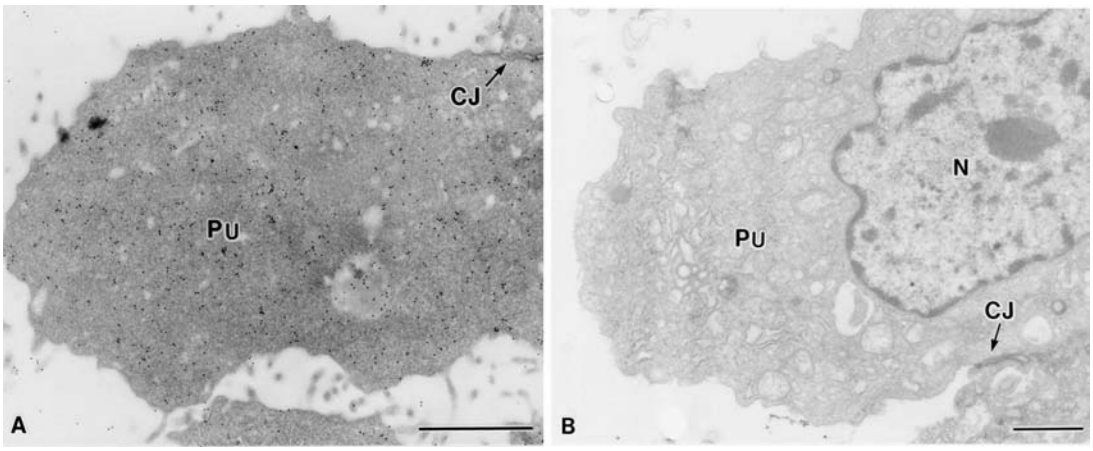
بر خلاف پینوپودها در جوندگان، در داخل گنبدهای رحمی اندامک‌های غشادار نظیر میتوکندری، کمپلکس گلژی، وزیکول‌های ترشحی و شبکه آندوپلاسمیک خشن قابل مشاهده بود (شکل 5B، 5C). کشیده شدن بخشی از هسته سلولی به داخل گنبدهای رحمی نیز در شکل 6B مشخص است. در شکل 5B و 5C، مراحل مختلفی از اگزوسیتوز وزیکول‌های ترشحی دیده می‌شود.

ایمونوهیستوشیمی برای میکروسکوپ نوری

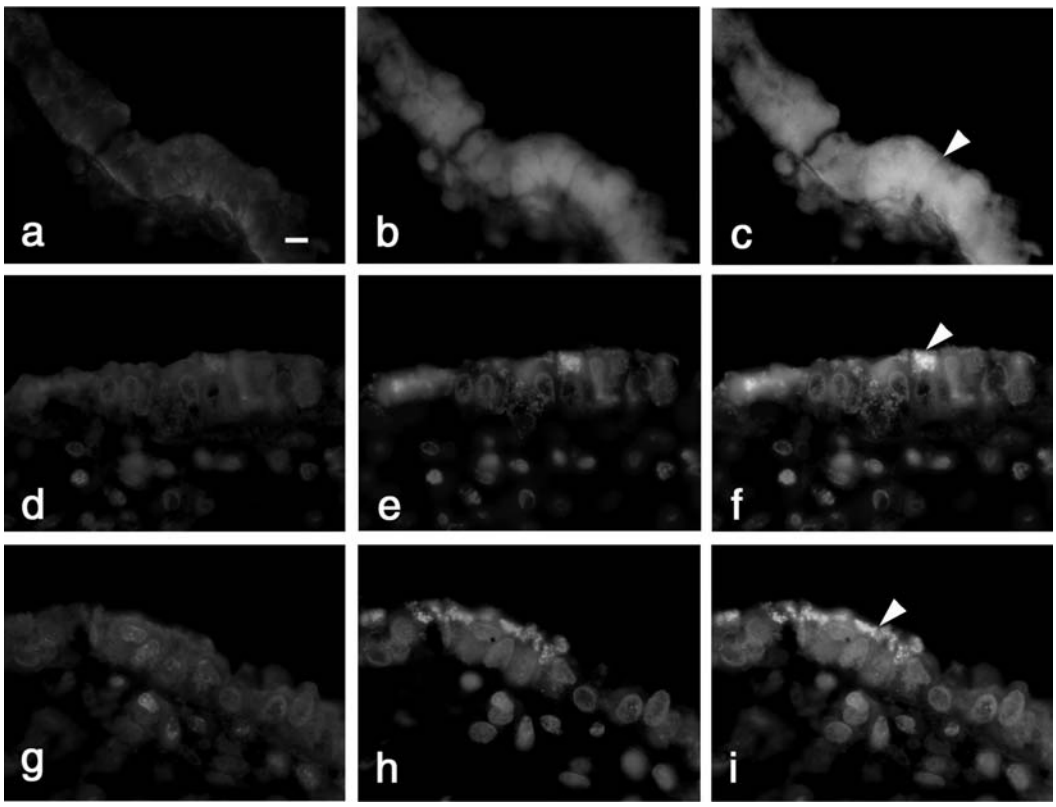
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی دوگانه فلورسنت برای LIF و یکی از

www.SID.ir

مارکرهای اختصاصی اگزوسیتوز شامل VAMP-2 (شکل ۷A، ۷B، ۷C) Syntaxin-1 (شکل ۷D، ۷E، ۷F) و SNAP-25 (شکل ۷G، ۷H، ۷I) نشان داد که مارکرهای فوق در سطح سلول‌های اپی‌تلیالی با LIF هم مکانی نشان می‌دهند (هم مکانی این پروتئین‌ها با رنگ زرد نشان داده شده است که حاصل ترکیب دو رنگ سبز و قرمز ناشی از دو آنتی بادی ثانویه است). رنگ آبی در تمامی اشکال، هستهٔ سلول‌ها را نشان می‌دهد که توسط DAPI رنگ‌آمیزی شده است. در گروه‌های کنترل منفی، رنگ خاصی قابل مشاهده نبود (اشکال مربوطه نشان داده نشده است).



شکل ۶: نشان‌دار کردن فاکتور مهارکننده لوسمی (LIF) با نانوگلدهای ۱۲ نانومتری در برش‌های فوق نازک بیوپسی از فاز میدلوتئال آندومتر انسان. در پانل A، بیان بالایی از LIF در داخل گنبد رحمی قابل مشاهده است. در پانل B که مربوط به گروه کنترل منفی است، ذرات طلای کونژوگه با آنتی‌بادی ثانویه باند شده با LIF مشاهده نمی‌شود.



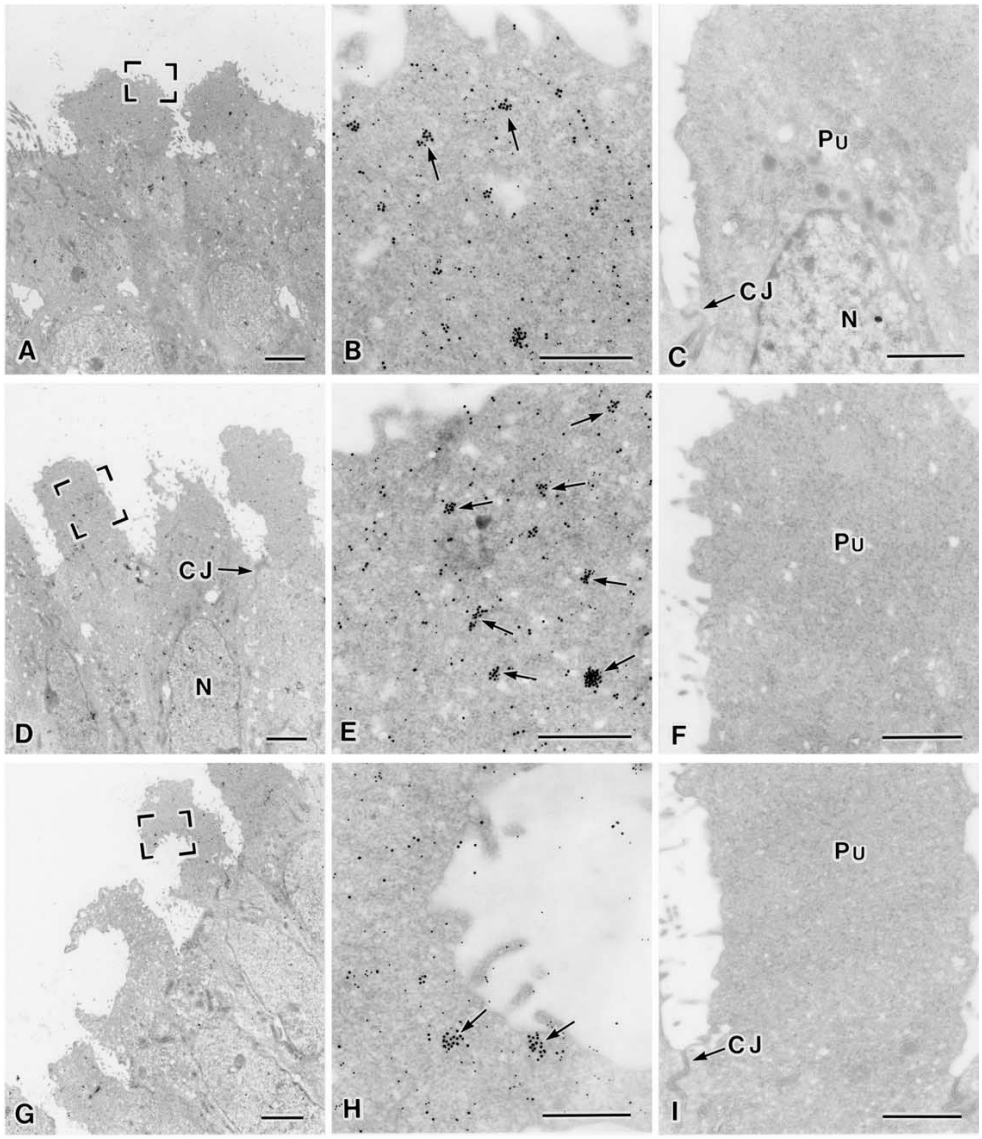
شکل ۷: تصاویر ایمونوفلورسنت از رنگ‌آمیزی دوگانه LIF با یکی از مارکرهای تخصصی اگزوسیتوز شامل:
(Vesicle-Associated Membrane Protein-2) VAMP-2 (a-c), Syntaxin-1 (d-f), (Synaptosomal protein-25) SNAP-25 (g-i)
بیوپسی‌های فاز میدلوتئال از سیکل رحمی نرمال انسان حاکی از هم‌مکانی LIF با سه مارکر فوق است. پانل‌های (a)، (d) و (g) برای LIF رنگ‌آمیزی شده است. پانل (b) VAMP-2، پانل (c) ترکیب (a) و (b) است. پانل (e) Syntaxin-1 و (f) ترکیب (d) و (e) است. پانل h توسط آنتی‌بادی SNAP-25 رنگ‌آمیزی شده است و پانل (i) ترکیبی از پانل‌های (g) و (h) است. در تمامی پانل‌ها رنگ آبی (DAPI) نشان‌گر هسته است. در پانل‌های ترکیبی، تغییر رنگ می‌تواند نشانه هم‌مکانی باشد. (مشاهده نمونه رنگی تصویر در انتهای مقالات)
Scale bar: 10μm

www.SID.ir

ایمونوهیستوشیمی برای میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن

به منظور ردیابی نحوه انتشار و جایگاه LIF در اپی‌تلیوم سطحی آندومتر و گنبدهای رحمی و همچنین بررسی هم مکانی LIF با مارکرهای اختصاصی اگزوسیتوز در داخل گنبدهای رحمی، رنگ‌آمیزی اختصاصی با طلا انجام شد. در فتومیکروگراف‌های ایمونوالکترون میکروسکوپی، بیان بالای LIF در گنبدهای رحمی سلول‌های اپی‌تلیوم آندومتر انسان که از بیوپسی فاز میدلوتئال تهیه شده بود، مشاهده شد (شکل ۶A). در نمونه‌های کنترل منفی، ذرات طلای کونژوگه با آنتی‌بادی ثانویه مشاهده نشد (شکل ۶B).

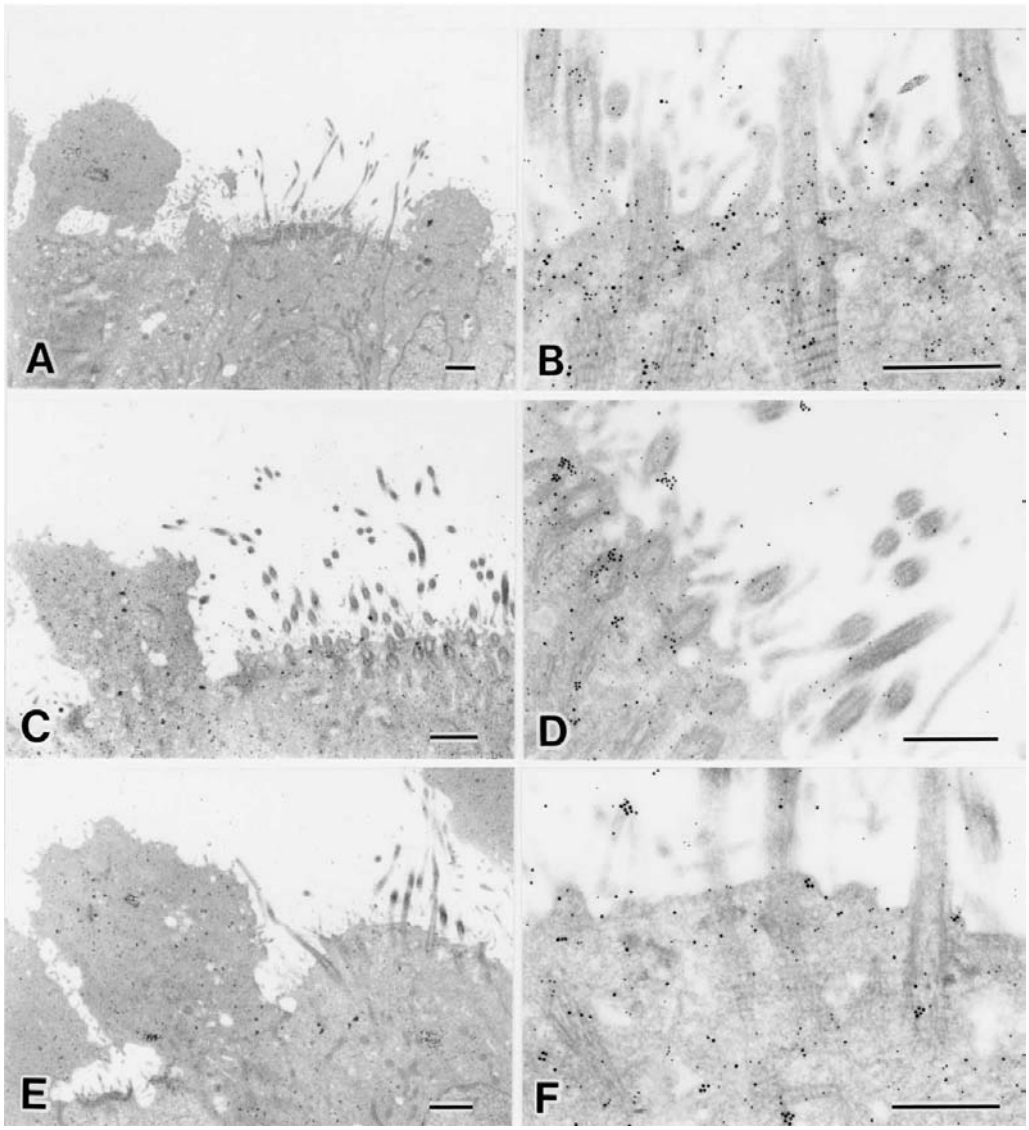
رنگ‌آمیزی دوگانه برای LIF و یکی از مارکرهای اختصاصی یاد شده در اگزوسیتوز، هم‌مکانی آنها را با گنبدهای رحمی نشان می‌دهد که حاکی از اگزوسیتوز LIF از گنبدهای رحمی در انسان است. در بعضی قسمت‌ها، هم‌مکانی LIF با VAMP-2, Syntaxin-1 و SNAP-25 به صورت کلاسترهایی با اندازه‌های مختلف دیده می‌شد (شکل ۸H ،۸E ،۸B). هیچ گونه واکنشی در گروه‌های کنترل که با آنتی‌بادی اولیه واکنشی نداشتند مشاهده نشد (شکل ۸C, F, I).



شکل ۸: رنگ‌آمیزی اختصاصی دوگانه ایمونوگلد برای TEM با ذرات نانوگلد در سایزهای مختلف: LIF ذرات طلای ۱۸ نانومتری و Syntaxin-1، SNAP-25 و VAMP-2 ذرات طلای کونژوگه به آنتی‌بادی ۱۲ نانومتری. با استفاده از بیوپسی‌های آندومتر انسان در فاز میدلوتئال، توزیع ساب سلولار LIF و هم‌مکانی آن با مارکرهای اختصاصی اگزوسیتوز در گنبدهای اپیتلیوم سطحی و غددی آندومتر بررسی شده است. پانل‌های (A) و (B) برای LIF و Syntaxin-1؛ (D) و (E) برای SNAP-25 و LIF؛ و (G) و (H) برای LIF و VAMP-2 رنگ‌آمیزی شده‌اند. در فتومیکروگراف‌های فوق هم‌مکانی LIF با مارکرهای ذکر شده به روشنی قابل وضوح است. هم‌مکانی یاد شده به صورت تجمعاتی از نانوگلدهایی با سایز متفاوت قابل رویت است. در پانل‌های (C)، (F) و (I) به عنوان گروه‌های کنترل منفی، نانوگلدهای نشان‌دار مشاهده نمی‌شود.

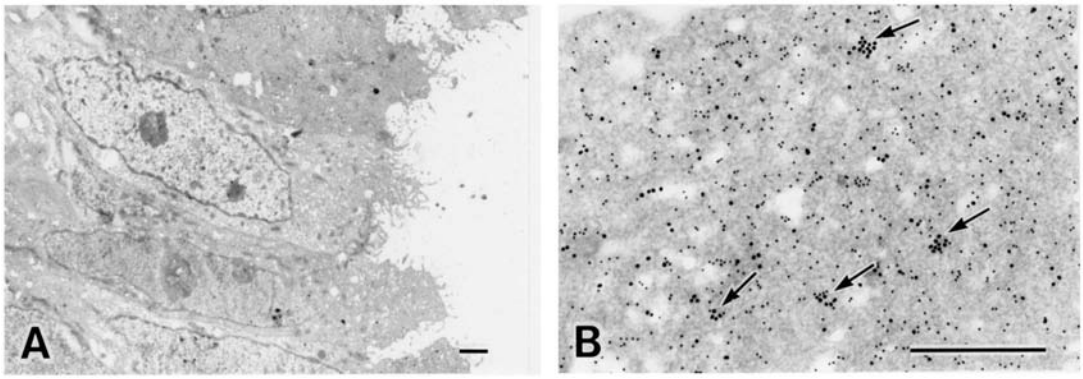
Scale bars: (A, D, G) 2μm, (B, E, H) 0.5μm, (C, F, I) 1μm

www.SID.ir



شکل ۹: رنگ‌آمیزی اختصاصی دوگانه ایمونوگلد TEM برای LIF و یکی از مارکرهای اختصاصی اگزوسیتوز شامل Syntaxin-1، VAMP-2 و SNAP-25 که با آنتی‌بادی‌های ثانویه کونژوگه با ذرات طلای ۱۲ و ۱۸ نانومتری مشخص می‌شوند. در برش‌های فوق نازکی که از نمونه‌های بیوپسی آندومتر انسان تهیه شد، مشخص گردید که LIF در مناطق فاقد گنبدهای رحمی، هم‌مکانی کمتری را با مارکرهای اگزوسیتوز نشان می‌دهد.

Scale bars: (A, C, E) 2μm, (B, D, F) 0.5μm



شکل ۱۰: رنگ‌آمیزی اختصاصی دوگانهٔ TEM برای LIF (که با ذرات طلای ۱۲ نانومتری نشان‌دار شده است) و Syataxia-1 (که با ذرات طلای ۱۸ نانومتری نشان‌دار شده است). با استفاده از برش‌های فوق نازک از بیوپسی آندومتر انسانی در فاز میدلوتئال در یک سیکل رحمی طبیعی، نحوه انتشار این پروتئین به طور غیرمستقیم در غدد رحمی نشان داده شده است. هم‌مکانی LIF با مارکرهای فوق به روشنی قابل رویت است و با پیکان نشان داده شده است.

Scale bars: (A) 1μm, (B) 0.5μm

www.SID.ir

در مناطق فاقد گنبدهای رحمی در اپی‌تلیوم سطحی، هیچ‌گونه هم‌مکانی بین LIF و مارکرهای اختصاصی یاد شده اگزوسیتوز مشاهده نشد و یا این هم‌مکانی ناچیز بود (شکل 9F، 9D، 9B). فتومیکروگراف‌های حاصل از سلول‌های اپی‌تلیوم غددی نیز هم‌مکانی بالای LIF را با مارکرهای اگزوسیتوز نشان دادند (شکل 10B).

بحث

در تحقیق حاضر، برای اولین بار نقش ترشحی برای گنبدهای رحمی (پینوپودها) در آندومتر انسان مطرح شده است. علاوه بر آن، ضمن آشکار شدن توزیع و بیان بالای LIF در گنبدهای رحمی انسان، معلوم شد که قسمتی از ترشحات رحمی LIF از طریق اگزوسیتوز و از محل گنبدهای رحمی در غدد و اپی‌تلیوم سطحی رحمی است. نتایج حاصل از این مطالعه چندین تفاوت فراساختاری که بین پینوپودها در جوندگان و گنبدهای رحمی در انسان مطرح شده بود را نیز نشان داده است (۷، ۳۱). به عنوان مثال در پینوپودها (در جوندگان)، ساختارهای سلولی عاری از ارگانل‌های غشادار گزارش شده‌اند؛ در حالی که در تایید گزارش‌های قبلی، در میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن گنبدهای رحمی در انسان در این مطالعه، ارگانل‌های غشادار نظیر هسته، میتوکندری، کمپلکس گلژی و شبکه آندوپلاسمیک خشن به وضوح قابل مشاهده است (۹، ۲۷، ۳۲، ۳۳). ضمن آن که علی‌رغم مشاهده واکوئل‌ها پینوسیتوزی بزرگ و فراوان در پینوپودهای جوندگان (نظیر موش کوچک و بزرگ آزمایشگاهی) (۷، ۳۴) ، در مشاهدات به عمل آمده در این تحقیق، واکوئل پینوسیتوزی در گنبدهای رحمی انسان دیده نشد.

یکی از یافته‌های جالب در این تحقیق، مشاهده گنبدهای رحمی فراوان در اطراف دهانه غدد رحمی است که برای اولین بار گزارش و به وضوح نشان داده شد. با مشاهدهٔ دقیق گنبدهای رحمی به ویژه در فاز میدلوتئال در اپی‌تلیوم سطحی و غددی آندومتر، سوراخ‌هایی در بخش راسی این برجستگی‌ها مشاهده شد که در برخی از آنها بخش بزرگی از غشا جدا شده بود و توده‌هایی از وزیکول‌های ترشحی نیز دراطراف این سوراخ‌ها دیده می‌شد. این حالت از پارگی و جداشدگی بخش راسی غشا پلاسمایی شباهت زیادی به مورفولوژی سلول‌های اپی‌تلیالی غدد انعقادی موش بزرگ آزمایشگاهی دارد که ترشح آپوکرین دارند (۳۵). بر اساس این مشاهدات، بر آن شدیم که به بررسی نقش ترشحی در گنبدهای رحمی آندومتر انسان بپردازیم.

با توجه به ارتباط زمانی مستقیم بین ظهور گنبدهای رحمی و ترشح LIF در انسان (۱۵) و نظر به اهمیت ویژه LIF به عنوان یکی از عناصر مغذی رحم (Histotrophs) برای رشد و بقا جنین قبل از لانه گزینی و هم چنین یکی از عوامل کلیدی در پذیرش رحمی (۳۶)؛ در این تحقیق، رابطهٔ مکانی LIF و گنبدهای رحمی و احتمال ترشح آن از گنبدهای رحمی مورد بررسی قرار گرفت. در فتومیکروگراف‌های حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوگلد در میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن در این مطالعه نشان داده شد که به میزان بالایی LIF در فراساختارهای سلولی گنبدی شکلی به نام گنبدهای رحمی آندومتر در انسان وجود دارد.

در حال حاضر، سه شکل از ترشح مواد توسط سلول‌ها تعریف شده است که شامل اگزوسیتوز (Exocytosis)، آپوکرین (Apocrine) و هلوکرین (Holocrine) است. بیشترین ترشحات از طریق اگزوسیتوز صورت می‌پذیرد که مارکرهای مختلف آن شناسایی شده‌اند و برخی از مارکرهای اختصاصی آن نظیر SNAP-25, VAMP-2 و Syntaxin-1 مورد بررسی‌های وسیعی قرار گرفته‌اند. در خصوص ترشح به روش آپوکرین، عمدتا بررسی‌های مورفولوژیک صورت پذیرفته است (۳۵)، و اطلاعات بسیار ناچیزی در ارتباط با دینامیک غشا پلاسمایی و بیومارکرهای اختصاصی آن در دسترس است (۳۷). در تحقیق حاضر، نشان داده شد که LIF (حتی در بعضی نقاط به صورت اجتماعاتی) با مارکرهای اختصاصی یاد شده اگزوسیتوز هم مکان است. این سه پروتئین کمپلکس هترودیمری را تشکیل می‌دهند به نام کمپلکس هسته (Core Complex) که حد واسط غشا سلول و وزیکول ترشحی قرار می‌گیرند (۳۹-۳۸).

علاوه بر آن در نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی‌های ایمونوگلد در میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن مشخص شده است که این هم مکانی در گنبدهای رحمی به مراتب بیش از مناطق عاری از گنبدهای رحمی است و هم مکانی آنها در اپی‌تلیوم سطحی و غددی آندومتر، هر دو دیده می‌شود.

به علاوه با توجه به اشکال متشابه با سلول‌های مترشحه از نوع آپوکرین، به نظر می‌رسد بخشی از ترشحات نیز می‌تواند به صورت آپوکرین باشد. روی هم رفته، نتایج حاصل از یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که پینوپودها (گنبدهای رحمی) در انسان علاوه بر نقش مهمی که در ارتباط اولیه با جنین پیش از لانه گزینی دارند (۷، ۴۰)، از طریق ترشح برخی مواد مهم در لانه‌گزینی نظیر LIF، نقش مهمی را در تغذیهٔ جنین و پذیرش رحمی نیز ایفا می‌کنند. ارایه مدل‌های مناسب *in vitro* و شناسایی مارکرهای بیشتر ترشحی (به ویژه در خصوص ترشحات آپوکرین)، به شناخت بیومولکول‌های بیشتری که در گنبدهای رحمی آندومتر ذخیره و ترشح می‌شوند، کمک خواهد کرد.

از نظر بالینی، LIF نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک تولیدمثل در انسان دارد. لذا شناخت دقیق مکانیسم ترشح LIF و راه‌های کنترل آن می‌تواند در پدیدهٔ پذیرش رحمی و در نهایت کنترل روند پیچیده لانه‌گزینی موثر واقع شود. بر اساس گزارش‌های انجام شده، اینترلوکین ۱- (Interleukin-1: IL-1)، فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor Necrosis Factor: TNF)، فاکتور رشد مشتق شده از پلاکت (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF)، فاکتور رشد تبدیل کننده (Transforming Growth Factor: TGF) و فاکتور رشد اپی‌درمی (Epidermal Growth Factor: EGF) القا کننده‌های بیان LIF در آندومتر انسان هستند (۴۱). در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود که با بلوک تولید LIF و یا عمل آن و یا مدیاتورهای آن در مدل‌های *in vivo* (نظیر موش ترانس ژنیک) نقش تنظیمی آن در پذیرش رحمی و لانه گزینی جنینی در

Archive of SID

www.SID.ir

سطوح مولکولی بررسی شود. علاوه بر آن، با مطالعه دقیق‌تر فیزیولوژی لانه‌گزینی، کنترل باروری از هر دو جهت کمک باروری و جلوگیری از بارداری امکان‌پذیر خواهد بود.

نتیجه گیری

از مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که بر اساس یافته‌های ارائه شده، گنبدهای رحمی (پینوپودها) در انسان نقش ترشحی دارند و این نتیجه، موید یافته‌های قبلی است که نشان دادند فراساختارهای فوق، علی‌رغم آنچه خوانده می‌شوند فاقد نقش پینوسیتوزی هستند (۱۰). بدین ترتیب، نشان داده شد که پینوپودها و گنبدهای رحمی علاوه بر تفاوت‌های ساختاری، از نظر عملکرد و فیزیولوژیک نیز متفاوتند. در حاشیه نشان داده شده است که LIF بیان بالایی در گنبدهای رحمی اپی‌تلیوم سطحی و غددی آندومتر دارد و احتمالا نقش عمده‌ای از ذخیره و ترشح آن توسط گنبدهای رحمی صورت می‌پذیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از همکاری کادر میکروسکوپ الکترونی بخش آناتومی دانشگاه علوم پزشکی کیورین (توکیو-ژاپن) کمال تشکر را دارند و این مقاله بخشی از نتایج طرح (۱۶۵۹۱۶۸۹) (Japan Society for the Promation of Science) است.

References

1. Minas V, Loutradis D, Makrigiannakis A. Factors controlling blastocyst implantation. Reprod Biomed Online, 2005; 10: 205-216

2. Murphy CR, Shaw TJ. Plasma membrane transformation: a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period. Cell Biol Int, 1994; 18: 1115-1128

3. Murphy CR. The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy. J Reprod Fertil, 2000; 55: 23-28

4. Nilsson O. Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. Early effect of estrogen administered to spayed animals. J Ultrastruct Res, 1958; 2: 73-95

5. Warren RH, Enders AC. An electron microscopic study of the rat endometrium during delayed implantation. Anat Rec, 1964; 148: 177-195

6. Nilsson O. Ultrastructure of the process of secretion in the rat uterine epithelium at preimplantation. J Ultrastruct Res, 1972; 40, 572-580

7. Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. Am J Anat, 1973; 138: 277-299

8. Guillomot M, Betteridge KJ, Harvey D, Goff AK. Endocytotic activity in the endometrium during conceptus attachment in the cow. J Reprod Fertil, 1986; 78: 27-36

9. Murphy CR. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopods or uterodomes? Hum Reprod, 2000; 15: 2451-2454

10. Adams SM, Gayer N, Terry V, Murphy CR. Manipulation of the follicular phase: Uterodomes and pregnancy: is there a correlation? BMC Pregnancy and Childbirth, 2001; 1: 2

11. Lessey BA, Appa Rao KB, Bagnell RC. Osteopontin normally localized to the apical surface of receptive endometrium, is lacking in women with endometriosis with aberrant $\alpha v\beta 3$ integrin expression. Fertil Steril, 2001; 76 Suppl 1: S60

12. StavreusEvers A, Nikas G ,Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptor. Fertil Steril, 2001; 76: 782-791

13. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. Pinopode expression during human implantation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002; 101: 104-108

14. Acosta AA, Neuberger L, Burgh M, Calamari JC, Chimes H, Dunce GF, Kliman H, Lema B, Lustig L, Papier S. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. Fertil Steril, 2000; 73: 788-798

15. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren B-M. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. Fertil Steril, 2003; 79: 808-814

16. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. 1992; Nature, 359: 76-79

17. Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA, Kowalik AI, Meyer WR, Lessey BA. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretary phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. Fertil

Archive of SID

www.SID.ir

Steril, 2003; 79: 970-974
18. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. Nature, 1992; 359: 76-77
19. Giess R, Tanasescu I, Steck T, Sendtler M. Leukemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. Mol Hum Reprod, 1999; 5: 581-586
20. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. J Reprod Fertil, 1994; 101: 421-426
21. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. Biol Reprod, 1994; 50: 882-887
22. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. Hum Reprod, 1997; 12: 569-574
23. Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. Am J Reprod Immunol, 1998; 39: 137-143
24. Sargent IL, Martin KL, Barlow DH. The use of recombinant growth factors to promote human embryo development in serum-free medium. Hum Reprod, 1998; 13 Suppl 4: 239–248
25. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. Hum Reprod, 1995; 10: 1907-1911
26. Keltz MD, Attar E, Buradagunta S, Olive DL, Kliman HJ, Arici A. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. Am J Obstet Gynecol, 1996; 175: 1611-1619
27. Bentin-Ley U, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. Hum Reprod. 1999; 14: 515-520
28. Johannisson E, Nilsson L. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. Fertil Steril, 1972; 23: 613-625
29. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. Hum Reprod, 1999; 14: 99-106
30. Adams SM, Gayer N, Hosie MJ, Murphy CR. Human uterodomes (pinopods) do not display pinocytotic function. Hum Reprod, 2002; 17, 1980-1986
31. Parr MB, Parr EL. Relationship of apical domes in the rabbit uterine epithelium during the peri-implantation period to endocytosis, apocrine secretion and fixation. J Reprod Fertil, 1982; 66: 739-744
32. Psychoyos A, Nikas G. Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity. Assist Reprod Rev, 1994; 4: 26-32
33. Dockery P, Ismail RMJ, Li TC, Warren MA, Cooke ID. The effect of a single dose of mifepristone (RU486) on the fine structure of the human endometrium during the early luteal phase. Hum Reprod, 1997; 12: 1778-1784
34. Parr MB, Parr EL. Endocytosis in the uterine epithelium of the mouse. J Reprod Fertil, 1977; 50: 151-153
35. Wiche R, Seitz J, Wilhelm B. Establishing of two in vitro models of epithelial cells from the apocrine secreting rat coagulating gland. Andrologia, 2003; 35: 34
36. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. Dev Biol, 2000; 223: 217-237
37. Gesase AP, Satoh Y. Apocrine secretory mechanism: recent findings and unresolved problems. Histol Histopathol, 2003; 18: 597-608
38. Calakos N, Bennett MK, Peterson KE, Scheller RH. Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. Science, 1994; 263: 1146-1149
39. Lonart G, Sudhof TC. Assembly of SNARE core complexes prior to neurotransmitter release set the readily releasable pool of synaptic vesicles. J Biol Chem, 2000; 275: 27703-27707
40. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Sakai K, Iwashita M. Tissue transglutaminase at embryo-maternal interface. J Clin Endocrinol Metab,

Archive of SID

www.SID.ir

protein biosynthesis in human endometrium. J Clin Endocrinol Metab, 1995; 80: 1908-1914

41. Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and 2005; 90: 4694-4702

Archive of SID

www.SID.ir