Archive of SID

مقدمه

یکی از عوامل تهدیدکنندهٔ زندگی اجتماعی و بقای خانواده در جوامع بشری، مشکل ناباروری است.مشکلی که زوجین جوان نابارور با آن روبه‌رو هستند، هزینه‌های گزاف باروری مصنوعی و آزمایشگاهی است. این مشکلات از آن جهت دو چندان می‌شود که متأسفانه آمار موفقیت باروری‌ها، با شیوهٔ آزمایشگاهی (IVF) هم‌اکنون نیز علی‌رغم پیشرفت چشمگیر علوم چندان رضایت‌بخش نیست (۳-۱).

از آنجایی که در کلینیکهای ناباروری در گام اول از پروتکلهای تحریک تخمک‌گذاری استفاده می‌کنند، این سؤال پیش می‌آید که «تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از هورمونهایی که بصورت اگزوژن تزریق می‌شود، بر روی قدرت پذیرش استرومای رحم چه اثری دارد؟»

در یک سیکل طبیعی رحمی، آماده شدن رحم جهت لانه‌گزینی و پذیرش جنین نیاز به عوامل هورمونی مناسبی دارد (٤). استروژن و پروژسترون از جمله هورمونهایی هستند که در ایجاد قابلیت پذیرش جنین توسط رحم مؤثرند و برهم خوردن تعادل این هورمونها در اثر عوامل خارجی منجر به عدم موفقیت در لانه‌گزینی می‌شود (٥).

یکی از مباحثی که هم‌اکنون مورد توجه محققان قرار گرفته نقش استرومای رحمی در پذیرش جنین است. استرومای رحمی از آن جهت که بستر مناسبی را جهت پذیرش جنین فراهم می‌آورد، اهمیت دارد؛ بنابراین در زمان لانه‌گزینی لازم است دچار تغییراتی شود که از آن با نام «دسیدوایی شدن» یاد می‌کنند (٦).

کامل شدن وقایع دسیدوایی یکی از فاکتورهای مؤثر در پذیرش جنین است. عوامل مؤثر در ایجاد دسیدوایی شدن عبارتند از عوامل هومورال و عوامل لوکالی که از سلولهای مهاجر استرومای رحم تولید می‌شود (۳). یکی از سلولهایی که در ری‌مدلینگ استرومای رحمی دخالت دارد، ماستوسیتها می‌باشند؛ زیرا این سلولها منابع هیستامین و پروستاگلاندینهایی هستند که جهت ایجاد دسیدوایی شدن استرومای رحمی لازم و ضروری محسوب می‌شوند(۷).

در زمینهٔ نقش ماستوسیتها و توزیع آنها در روند لانه‌گزینی گزارشهای کمی از پژوهشگران ارائه شده است؛ لذا در تحقیق حاضر توزیع ماستوسیتهای استرومایی در طی لانه‌گزینی طبیعی و لانه‌گزینی پس از سوپراوولاسیون مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

در این تحقیق از موش بالغ نژاد balb/c استفاده شد. تعداد ۲۸ سر از موشهای بالغ ماده با محدودهٔ سنی ۱۰ـ٦ هفته به مدت یک هفته برای سازگاری با محیط در حیوانخانهٔ دانشگاه علوم پزشکی کردستان نگهداری و سپس بطور تصادفی به ٤ گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

۱) گروه شاهد I : موشهای ماده یک‌به‌یک بمنظور جفت‌گیری در کنار موشهای نر عقیم قرار گرفتند و تعیین روز حاملگی (کاذب) صبح روز بعد با مشخص شدن پلاک واژن صورت گرفت. پس از ۳/۵ روز (۸٤ ساعت) جانوران به‌روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و شاخهای رحمی آنان خارج، و ۳ mm^3 از ناحیهٔ وسطی آن جهت مطالعات میکروسکوپ نوری انتخاب شد. نمونهٔ کوچکتری هم به اندازه ۱mm^3 برای مطالعهٔ میکروسکوپ الکترونی برگزیده شد.

۲) گروه شاهد II: مشابه گروه شاهد I عمل کرده و این بار پس از گذشت ٤/٥ روز (۱۰۸ ساعت) نمونه‌برداری صورت گرفت.

۳) گروه تجربی I: تعداد ۱۰ سر موش balb/c ابتدا با استفاده از تزریق داخل صفاقی (Ip) ۱۰ واحد از هورمون hMG تحریک تخمک‌گذاری شدند و پس از

www.SID.ir

Archive of SID

گذشت ۲٤ ساعت ۱۰ واحد hCG بصورت داخل صفاقی تزریق شده و در کنار موشهای نر عقیم قرار گرفتند. پس از ۳/۵ روز (۸٤ ساعت) از تزریق hCG جانور به روش جابجایی مهره‌های گردنی، نخاعی شده و با روشی مشابه با گروه شاهد مورد نمونه‌برداری قرار گرفت. در این روش موشهای ماده و موشهای نر عقیم شده در یک قفس نگهداری شدند (۸).

۴) گروه تجربی II : مشابه گروه تجربی I عمل شد و این بار پس از گذشت ٤/۵ روز (۱۰۸ ساعت) نمونه‌برداری صورت گرفت (۸). نمونه‌ها در محلول بوئن فیکس شده و جهت مطالعات بافتی پروسس داده شدند. بخشی از نمونه‌ها نیز جهت مطالعات میکروسکوپ الکترونی انتقالی آماده شدند.

در بخش مطالعات میکروسکوپی نوری با استفاده از میکروتوم برشهایی به ضخامت ۵µ از نمونه‌های رحمی تهیه گردید. برشها به تناوب ۱ به ۵ انتخاب و با استفاده از روش اختصاصی تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند. سپس با استفاده از گراتیکول مدرج تعداد ماستوسیتها در $1mm^3$ از بافت رحمی مورد بررسی و شمارش قرار گرفت و نتایج گروه‌های کنترل و آزمایش با استفاده از آزمون Student-T test مقایسه شد (۹).

در ضخامت مطالعات میکروسکوپی الکترونی انتقالی، با استفاده از اولترمیکروتوم برشهایی به ضخامت ۲۰ nm از نمونه‌های رحمی تهیه و پس از رنگ‌آمیزی اورانیل استات و لیدسیترات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

بررسی توزیع ماستوسیتهای بافت رحمی

الف- گروه کنترل

در بررسیهای صورت گرفته ماستوسیتها در نمونه‌های میکروسکوپی این گروه مشاهده شدند (تصویر ۱). مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که این سلولها عمدتاً در طبقهٔ آدوانتیس و عضلانی رحم استقرار یافته‌اند. میانگین تعداد ماستوسیتها در روزهای ۳/۵ و ٤/۵ پس از لقاح به ترتیب ۱۱/۱٤ و ۱۱/٤۲ عدد در هر میلی‌متر مربع بود (جدول ۱).

تصویر ۱) آندومتریوم موش، گروه کنترل ۴/۵ روز پس از تحریک تخمک گذاری. رنگ آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی X۲۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

ب- گروه سوپراوولاسیون

بر اساس بررسیهای هیستولوژیکی رحم، ماستوسیت‌ها در نمونه‌های میکروسکوپی این گروه مشاهده شد (تصویر۲). مشاهدات میکروسکوپی همچنان نشان داد که این سلولها عمدتاً در طبقه عضلانی و لایهٔ لامیناپروپریای رحم استقرار یافته‌اند. میانگین تعداد ماستوسیتهای میانگین گروههای ۳/۵ و ٤/٥ روز پس از لقاح به ترتیب ۱۳/۸۵ و ۱۳/۵۷ بود که در مقایسه با گروه کنترل این تعداد بصورت معنی‌داری افزایش یافت. بررسیها با استفاده از میکروسکوپ TEM نشان داد که در گروههای آزمایش، ماستوسیت‌ها بیشتر در فاز دگرانولاسیون هستند. (تصویر۳).

تصویر ۲) آندومتریوم موش، گروه آزمایش ۴/۵ روز پس از تحریک تخمک‌گذاری. رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی ۴۰۰ X

تصویر ۳) تصویر میکروسکوپ الکترونی ماست سل استرومای رحمی گروه آزمایش ۴/۵ روزه پس از تحریک تخمک‌گذاری، بزرگنمایی ۵۲۵۰X

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱) میانگین تعداد ماستوسیتهای ۳/۵ و ۴/۵ روزه پس از لقاح

گروهها	کنترل ۱	آزمایش ۱	کنترل ۲	آزمایش ۲
میانگین تعداد ماستوسیتها	۱۱/۱٤±۱/۳۵*	۱۳/۸۵±۱/۰۶	۱۱/٤۲±۱/۲۷*	۱۳/۵۷±۰/۹۷

* بین نمونه‌های کنترل و آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۰۱)

گروه آزمایش ۱: گروه سوپراوولاسیون ۳/۵ روزه گروه آزمایش ۲: گروه سوپراوولاسیون ٤/۵ روزه

بحث

در تحقیق حاضر توزیع ماستوسیتهای رحمی در زمان لانه‌گزینی بررسی شد. در نمونه‌های گروههای آزمایشی، مطالعات بافتی نشان داد که با سوپراوولاسیون تخمدانی، جمعیت ماستوسیتهای بافت رحمی گروههای آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد. نکتهٔ حائز اهمیت در تحقیق حاضر تفاوت در توزیع ماستوسیتهای گروههای آزمایشی و کنترل بود. در گروههای کنترل این سلولها در طی دورهٔ لانه‌گزینی در نواحی محیطی لایهٔ عضلانی و طبقهٔ آدوانتیس رحمی پراکنده بودند اما در گروههای آزمایشی این سلولها بیشتر در نواحی مرکزی‌تر یعنی بخش داخلی‌تر لایهٔ عضلانی و در لامینا پروپریا یافت شدند. در رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوییدین‌بلو سلولهایی با ویژگی ماست‌سل در بین سلولهای اپی‌تلیال رحمی نیز دیده شد که لازم است در این زمینه تحقیقات بیشتری صورت گیرد.

مطالعات میکروسکوپی الکترونی نشان داد که در گروههای آزمایشی بیشتر ماست‌سلها در فاز دگرانولاسیون مشاهده شدند. مطالعات همچنین نشان داده که ماست‌سلها در روند دسیدوایی شدن سلولهای استرومایی رحم ممکن است دخالت داشته باشند. واکنش متاکروماتیکی استرومای رحم در دورهٔ پروژسترونی بیانگر حضور هیستامین در این مرحله از سیکل رحمی است و ماستوسیتها بعنوان منابع هیستامینی در بافتهای همبندی مطرح هستند؛ لذا این سلولها در القای واکنش دسیدوایی نقش دارند.

اما سؤال قابل طرح این است که با انجام سوپراوولاسیون و در طی روند لانه‌گزینی جنین، توزیع ماستوسیتهای رحمی چگونه است؟

Cocchirara و همکارانش در سال ۱۹۹۲ نشان دادند که استرادیول باعث پیشبرد تخلیه و دگرانولاسیون ماست‌سلها می‌شود. این تغییرات بویژه در فاز قبل از لانه‌گزینی به حداکثر می‌رسد (۱۰)؛ بنابراین شاید بتوان گفت که در تحقیق حاضر هرچند که با سوپراوولاسیون تخمدانی، تخمک‌گذاری تحریک می‌شود اما احتمال دارد که بین این رویداد و بلوغ استرومایی در جهت پذیرش جنین هماهنگی وجود نداشته باشد. به عبارت دیگر هرچند که پس از سوپراوولاسیون تخمک‌گذاری روی داده است، اما استروما از نظر تکاملی هنوز در مرحله استروژونیک است.

Cuanine و همکارانش در سال ۱۹۹۸ با انجام عمل اواریکتومی دریافتند که در یک سیکل جنسی بین سطح هورمون استروژن و فعالیت ماست‌سلها رابطه‌ای وجود دارد؛ بدین ترتیب که در حضور استرادیول، جمعیت ماست‌سلها افزایش یافته و میزان تولید و ترشح هپارین و هیستامین نیز بیشتر می‌شود (۱۱). در تحقیق حاضر واکنش متاکروماتیکی استرومایی که پس از سوپراوولاسیون صورت گرفته، نشانهٔ دگرانولاسیون ماست‌سلهای رحمی و وجود هپارین و هیستامین در بافت رحمی است که این تغییرات احتمالاً نشانهٔ مرحلهٔ استروژنیکی استرومای رحمی می‌باشد.

تحقیقات Matsomoto و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی دگرانولاسیون ماستوسیتها و ائوزینوفیلها

www.SID.ir

Archive of SID

در طی یک سیکل رحمی نشان داد که ماستسل‌ها نقشی اساسی در لانه‌گزینی دارند اما دگرانولاسیون ماستسلها که در طی دسیدوایی شدن استروما روی می‌دهد، بر روی قدرت انقباضی رحم نقشی ندارد (۱۲). بنابر این حضور ماستسلها در طی سوپراوولاسیون شاید نشانهٔ دفع جنین بدلیل افزایش قدرت انقباضی لایه عضلانی رحم در طی پروسهٔ لانه‌گزینی نباشد؛ اما احتمالاً نشانگر این نکته است که استرومای رحمی هنوز قابلیت لازم برای پذیرش جنین را ندارد.

Madhapan و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اثرات Corticotropic Realeasing Hormone، تریپتاز و اینترلوکین ۸ را در دفع خودبخودی جنین بررسی کردند. مطالعات آنها نشان داد در حالتی که جنین بصورت خود بخود دفع می‌شود، دگرانولاسیون ماستسلها روی می‌دهد و واسطه‌های دگرانولاسیون از جمله تریپتاز و انترلوکین ۸ دفع جنین را سبب می‌گردند (۱۳).

Uchide و همکارانش در سال ۲۰۰۲ با بررسی تغییرات بافت رحمی در مدل آزمایشگاهی اندومتریوزیس، گزارش دادند که پس از این عارضه، ماستسلهای رحمی افزایش می‌یابند. براساس یافته‌های ایشان حضور ماستسلها بر روی قدرت پذیرش رحم و پدیدهٔ لانه‌گزینی اثر مهاری دارد (۱٤).

Sirvidis و همکارانش در سال ۲۰۰۱ تغییرات جمعیت ماستوسیتها را در رحم طبیعی بررسی کردند. بر اساس یافته‌های آنها در طی دوران خونریزی، تعداد ماستوسیتهای طبقهٔ فانکشنال رحمی افزایش می‌یابد؛ اما چنانچه حاملگی صورت گیرد، ماستوسیتها در این لانه مشاهده نخواهند شد (۱۵).

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان گفت که ماستوسیتها هرچند ممکن است در مراحل قبل از لانه‌گزینی بر ایجاد روند دسیدوایی شدن اثرات مثبتی داشته باشند، اما در زمانی که لانه‌گزینی صورت می‌گیرد، حضور آنها بر روند مذکور اثرات منفی دارد.

با توجه به یافته‌های دیگر پژوهشگران و یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان گفت که سوپراوولاسیون احتمالاً باعث می‌شود که استرومای رحم در مرحلهٔ قبل از لانه‌گزینی متوقف شود و بنابراین حتی با وجود انتقال جنین این امکان وجود دارد که لانه‌گزینی موفقیت‌آمیز نباشد، زیرا در زمان لانه‌گزینی، رحم هنوز در مرحلهٔ استروژنیک بوده و شرایط لازم را برای لانه‌گزینی ندارد. براساس این شواهد می‌توان گفت که احتمالاً پس از تحریک تخمک‌گذاری و در زمان لانه‌گزینی، استرومای رحم هنوز فاقد شرایط لازم برای پذیرش جنین است.

References:

1. Psychoyo A. Uterin receptivity for nidation. Ana NY Acad Sci 1986, 476:36-42.
2. Psychoyo A. Hormonal control of ovoimplantation. Vitgam Horm 1973, 31:207-256.
3. Psychoyo A. Uterin receptivity for nidation. J Reprod Fertility 1979, 25: 17-28.
4. Hoise MJ., Murphy CR. Clomiphen citrate alters surface ultrastructure of uterine luminal epithelial cell. Anat Rec 1992,145:175-78.
5. Gunian A. Effect of ovarian hormone on cell membrane in rat uterus. Eur J Obset Gynecol Reord Biol 1995, 60(1): 69-74.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Madhappan B, Kempuraj D, Christodoulou S, Tsapikidis S, Boucher W, Karagiajnnis V and et al. High levels of intrauterine corticotropin-releasing hormone, urocortin, tryptase, and interleukin-8 in spontaneous abortions. Endocrinology 2003, 144(6): 2285-90.
7. Hogan B., Beddington R., Lacy E. Manipulating the mous embryuo. A laboratory manual cold spring harbor laboratory press (CSHL Press) 1994: 21-133.
8. Girolamo Ranteri, Letizia Passanttno, Rosa Partuno. The dog mast cell tumour as a model to study the relationship between angiogenesis mast cell density and tumour malignancy. Oncology reports 10: 1189-1193, 2003 laboratory manual cold spring harbor laboratory press (CSHL Press) 1994: 21-133.
9. Cocchiara R, Albeggiani G, Di Trapani G, Azzolina A, Lampiasi N, Rizzo F and et al. Oestradiol enhances in vitro the histamine release induced by embryonic histamine-releasing factor (EHRF) from uterine mast cells. Hum Reprod 1992, 13(3): 258-94.
10. Gunin AG, Sharov AA. Role of mast cells in oestradiol effects on the uterus of ovariectomized rats. J Reprod Fertil 1998, 113:61-8.
11. Matsumoto K, Ogasawara T, Kato A, Homma T, Iida M, Akasawa A, and et al. Eosinophil degranulation during pregnancy and after delivery by cesarean section. Int Arch Allergy Immunol 2003, 131 Suppl 1: 34-9.
12. Madhappan B, Kempuraj D, Christodoulou S, Tsapikidis S, Boucher W, Karagiannis V and et al. High levels of intrauterine corticotropin-releasing hormone, urocortin, tryptase, and interleukin-8 in spontaneous abortions. Endocrinology 2003, 144(6): 2285-90.
13. Uchiide I, Ihara T, Sugamata M. Pathological evaluation of the rat endometriosis model. Fertil Steril 2002, 78(4): 782-6.
14. Sivridis E, Giatromanolaki A, Agnantis N, Anastasiadis P. Mast cell distribution and density in the normal uterus-metachromatic staining using lectins. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001, 98(1): 109-1

www.SID.ir

Archive of SID

The Study of Mast Cells Distribution in Mice (balb/c) Uterus After Ovarian Superovulation During Implantation Period

Rezaei, Mj., Ph.D.,[1] Alasvand, M., M.Sc.,[2] Ahmadi, S., Ph.D.,[3] Rezazadeh, M., Ph.D.,[4] Rezaei, Sh., M.D.,[5] Sabeti, P., M.Sc.,[6] Rahimzadeh, A., M.D.,[7] Andalibi, P., Pharm. D.,[8] Ghadermarzi, M., Ph.D.[9]

ABSTRACT

Introduction: Clinical evidence indicates the existence of a narrow window of uterine receptivity which opens during the mid-luteal phase.The polarity of endometrium and formation of pinopodes on the apical surfaces of the endometrial epithelial cells and stromal decidualization occurs at the same time. This study was conducted to find a specific marker for receptivity by evaluating mast cell distribution in the pre-implantation and implantation period after mice ovarian superovulation using human menopausal gonadotropic hormone (hMG) and human chorionic gonadotropic hormones (hCG).

Materials & methods: Female balb/c mice (n-28) 6-10 weeks old were housed under standard conditions and divided into controls and superovulated groups. The mice of the control group were rendered pseudo pregnant. Superovulation was done in the experimental group using intraperitoneal injection of 10 i.u hMG, followed by (46 h later) injection of 10 i.u. hCG. On the evening of the second injection the mice were rendered. The mice of each group were sacrificed by cervical dislocation 3.5 and 4.5 days after induction of pseudo pregnancy. Samples were obtained from middle 1/3 part of the uterine horns and fixed and processed for light microscopy and electron microscopic studies. For light microscopy, samples fixed in Bouin's solution, processed routinely and tissue sections stained by Toluidine blue reagent. Mast cell counting in controls and experimental groups performed using graticule and analyzed by Student- T tests. For transmission electron microscopy, the samples of the uterine horns were flushed with buffer phosphate sodium cacodylate buffer (pH= 7.2). Samples were fixed first with 2.5% glutaraldehyde in cacodylatebuffer (pH= 7.2) then 1% osmium tetroxide. The specimens dehydrated in gradient concentrations of acetone and then polymerized in resin. Ultra thin sections studied using a transmission electron microscope.

Results: Morphometric studies showed significant increase in the number of mastocytes after superovulation in comparison to control groups. In control groups mast cells reside in muscular and adventitial layer but in experimental group there were many mast cells especially in the muscularis layer and lamina propria. Most of the mast cells were in the degranulation stages.

Conclusions*:* Superovulation made significant increase in the number of deregulated mast cells in the preimplantation and implantation periods which may play an inhibitory effect on implantation.

Key words: superovulation, Mast cell, implantation, ultarstructure

1. Assistant Professor of Histology & Anatomy Department, Kurdistan University of Medical Sciences, Pasdaran Ave., Sanandaj, Corresponding Author.
2. Master in physiology, Kurdistan University of Medical Sciences.
3. Assistant Professor of Physiology, Kurdistan University of Medical Sciences.
4. Professor of Anatomy Department, Tarbiat Modarres University of Medical Sciences.
5. General Practitioner, Kurdistan University of Medical Sciences, Corresponding Author.
6. Master in Anatomy & Histology, Kurdistan University of Medical Sciences.
7. Assistant Professor of Gynecology & Obstetric Disease, Kurdistan University of Medical Sciences.
8. Pharmacist, Kurdistan University of Medical Sciences.
9. Assistant Professor of Biochemistry, Kurdistan University of Medical Sciences.

www.SID.ir