Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:56 +0330 on Sunday December 24th 2017

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات فراساختاری اپی تلیوم رحم موش پس از تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از استروژن و پروژسترون

فاطمه افشاری[1]، بهروز نیک نفس[2]، عبدالرحمان دزفولیان[3]

تاریخ دریافت: ۹۰/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۷/۲۹

چکیده

پیش زمینه و هدف: لانه‌گزینی موفق بلاستوسیست در آندومتر نیازمند محیط هورمونی مناسب می‌باشد. هورمون‌های تخمدانی مسئول آماده‌سازی آندومتر برای لانه گزینی می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر فراساختمان اپی تلیوم لومینال آندومتر در موش‌های تحریک تخمک‌گذاری شده در زمان پنجره لانه گزینی می‌باشد.

مواد و روش کار: بعد از ایجاد حاملگی کاذب، موش‌ها به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. در گروه آزمایش موش‌ها پس از تحریک تخمک‌گذاری، با موش‌های وازکتومی شده، جهت جفت‌گیری قرار داده شدند و بر اساس دریافت هورمون به پنج گروه تقسیم گردیدند.۱) گروه شاهد آزمایشی ۲) استروژن، ۳) پروژسترون، ۴) استروژن + پروژسترون، ۵) آنتی پروژسترون + استروژن. درگروه کنترل نیز حاملگی کاذب به صورت طبیعی ایجاد شد. ۴/۵ روز بعد از حاملگی کاذب از شاخ‌های رحمی تمامی گروه‌ها نمونه برداری شد و جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی انتقالی آماده شدند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده بیانگر آن است که تزریق پروژسترون باعث کاهش طول میکروویلی‌ها و موجب افزایش رشد پینوپودها می‌گردد و تزریق استروژن موجب افزایش طول و تعداد میکروویلی‌ها می‌گردد. در حالی‌که استفاده همزمان استروژن و پروژسترون موجب کاهش طول میکروویلی‌ها و نیز موجب بروز پینوپودها می‌شود.

بحث و نتیجه گیری: در مجموع به نظر می‌آید که تجویز پروژسترون به تنهائی نمی‌تواند شرایط مناسبی را مشابه با گروه کنترل برای پذیرش جنین فراهم آورد و افزودن استروژن به پروژسترون در فاز حمایتی لوتئال شرایط بهتری را جهت لانه گزینی جنین ایجاد می‌کند.

کلید واژه‌ها: لانه گزینی، تحریک تخمک‌گذاری، استروژن، پروژسترون

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و دوم، شماره پنجم، ص ۳۹۸-۳۹۳، آذر و دی ۱۳۹۰

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه هیستوپاتولوژی و آناتومی، تلفن: ۰۹۱۴۱۱۴۷۷۹۴

Email: f_afshar@iaut.ac.ir

مقدمه

لانه گزینی پدیده‌ای است متشکل از چندین رخداد متوالی است که با لقاح تخمک آغاز شده و تا قرار گیری بلاستوسیست در آندومتر ادامه می‌یابد(۱). لانه گزینی موفق به کیفیت جنین و پذیرندگی آندومتر وابسته است (۲). در طی لانه گزینی، غشاء راسی اپی تلیوم لومینال آندومتر دچار تغییراتی می‌گردد. پینوپودها به تغییرات فراساختاری گفته می‌شود که در آن سطح آپیکال سلول‌های اپی تلیالی لومینال آندومتر، میکروویلی‌های خود را از دست داده و دارای برآمدگی‌های سیتوپلاسمی می‌شوند (۳).

Stavreus در سال ۲۰۰۱ نشان داد که تشکیل پینوپودها در آندومتر انسان همراه با غلظت بالای پروژسترون و رسپتورهای آن می‌باشد (۴). مطالعه Quin و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ نشان داد که تشکیل پینوپودها در انسان وابسته به پروژسترون بوده و در سرتاسر فاز لوتئال دیده می‌شوند (۵). در حالی‌که مطالعه انجام گرفته توسط obrna و همکارانش در سال ۲۰۰۴ نشان داد که پروژسترون درمانی در زنان تاثیری در زمان بروز پینوپودها ندارد (۶).

[1] استادیار گروه هیستوپاتولوژی و آناتومی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز (نویسنده مسئول)

[2] دانشیار علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[3] دانشیار بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:56 +0330 on Sunday December 24th 2017

تحقیقات Hoise نیز نشان می‌دهد که تزریق پروژسترون به مدت سه روز متوالی در موش‌هائی که تخمدان‌هایشان برداشته شده است موجب رشد پینپودها، افزایش قطرات ترشحی و ظهور میکروویلی‌های کوتاه در سطح سلول می‌شود (۷). بررسی‌ها نشان می‌دهد که با انتقال جنین‌های موش در رحم و استفاده از استروژن با دوز کم همراه با پروژسترون، می‌توان زمان پذیرندگی رحم را افزایش داد و بدین ترتیب موجب تغییر در پنجره لانه گزینی شد (۸).

محققان در سال‌های اخیر با بررسی مجدد در استفاده از استروژن همراه با پروژسترون جهت فاز حمایتی لوتئال توانستند نشان بدهند که حاملگی بالینی در انسان نسبت به استفاده از پروژسترون تنها بیشتر است (۱۱-۹).

بر اساس مطالعات انجام گرفته نقش استروژن و پروژسترون بر اپی تلیوم آندومتر در دوره‌ی طبیعی مشخص است ولی نقش دقیق این هورمون‌ها برای حمایت فاز لوتئال بعد از تحریک تخمک‌گذاری شناخته شده نیست و در مورد افزودن استروژن به پروژسترون اختلاف نظر وجود دارد. این تحقیق بر آن شده است که شاخص‌های مورفولوژیکی پنجره لانه گزینی (ناحیه آپیکال اپی تلیوم لومینال آندومتر) را در گروههائی که استروژن، پروژسترون، استروژن همراه با پروژسترون دریافت می‌کنند، مطالعه و مقایسه کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد مطالعه: در این تحقیق (تجربی) از موش‌های نر و ماده با سن ۱۰-۸ هفته(Balb/c) و با وزن ۲۵-۳۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی با امکانات دسترسی به آب و غذای کافی نگهداری می‌شدند.

داروهای مورد استفاده: داروهای محرک تخمک‌گذاری شامل PMSG، HCG و هورمون‌های مورد استفاده شامل استروژن، پروژسترون و آنتی پروژسترون RU 486 (شرکت سیگما) بود. برای ایجاد حاملگی کاذب، حیوانات نر ۸ هفته تحت عمل وازکتومی دو طرفه قرار گرفتند.

موش‌های وازکتومی شده بعد از طی دوران بهبودی با حیوانات ماده تحت آزمایش جهت جفت‌گیری قرار داده شدند. سپس موش‌ها بر اساس تحریک و عدم تحریک تخمک‌گذاری به دوگروه تقسیم شدند. گروه کنترل و گروه تجربی. در گروه تجربی، به موش‌ها ماده داروی PMSG[1] به میزان ۱۰ واحد و ۴۸ ساعت بعد از آن داروی HCG[2] به میزان ۱۰ واحد به صورت داخل صفاقی تزریق شد. صبح روز بعد از جفت‌گیری، موش‌های مورد مطالعه، بعد از کنترل پلاک واژینال به شش گروه تقسیم شدند. لازم به ذکر است که در هر گروه پنج موش مورد مطالعه قرار گرفت.

۱) گروه کنترل: جهت ایجاد حاملگی کاذب در این گروه، حیوانات بدون دریافت داروهای تحریک تخمک‌گذاری، فقط در مجاورت با موش‌های نر وازکتومی شده قرار گرفتند. ۲) گروه شاهد آزمایشی (sham):در این گروه بعد از تحریک تخمک‌گذاری، موش‌ها هورمونی را دریافت نکردند.۳) گروه استروژن: بعد از تحریک تخمک‌گذاری، از روز اول حاملگی کاذب، استروژن به میزان ۱۰ng به صورت زیر جلدی، به مدت چهار روز تزریق شد. ۴) گروه پروژسترون: بعد از تحریک تخمک‌گذاری، از روز اول حاملگی کاذب، روزانه ۱mg پروژسترون تا چهار روز به صورت زیر جلدی تزریق شد. ۵) گروه استروژن همراه با پروژسترون: موش‌های تحریک تخمک‌گذاری شده از روز اول حاملگی کاذب، روزانه ترکیبی از هورمون‌های استروژن به میزان ۱۰ng و پروژسترون به مقدار ۱mg را تا چهار روز به صورت زیر جلدی دریافت می‌کردند.۶) گروه آنتی پروژسترون همراه با استروژن: موش‌های تحریک تخمک‌گذاری شده از روز اول حاملگی کاذب، روزانه ترکیبی از هورمون‌های آنتی پروژسترون (RU 486) به میزان ۱ mg و استروژن به مقدار ۱۰ ng به مدت چهار روز به صورت زیر جلدی دریافت می‌کردند.

در تمامی گروه‌ها، حیوانات در روز ۴/۵ بعد از حاملگی کاذب با جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند واز یک سوم میانی شاخ‌های رحمی نمونه برداری شد. نمونه‌های به دست آمده در گلوتارآلدئید ۲/۵درصد به عنوان فیکساتیو اولیه و سپس در اسمیوم تتراکسایید ۱درصد به عنوان فیکساتیو ثانویه قرار گرفتند. پس از آب‌گیری با الکل و آغشتگی با رزین اپون و بعد از تهیه قالب‌های رزینی، برش‌های نیمه نازک با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو و برش‌های نازک با رنگ آمیزی اورانیل استات و سیترات سرب تهیه گردید و برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی (TEM) آماده شدند. همچنین بروز پینپودها و میکروویلی‌ها در اپی تلیوم لومینال به صورت نیمه کیفی با استفاده از معیار plus (+) مورد بررسی قرار گرفت.

[1] pregnant mare serum gonadotrophin
[2] human chorionic gonadotrophin

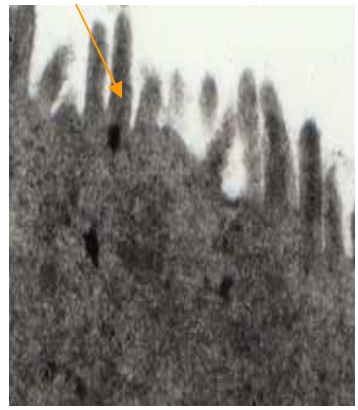
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:56 +0330 on Sunday December 24th 2017

جدول شماره (۱): ارزیابی میکروویلی‌ها و پینپودها را در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از معیار (+) نشان می‌دهد.

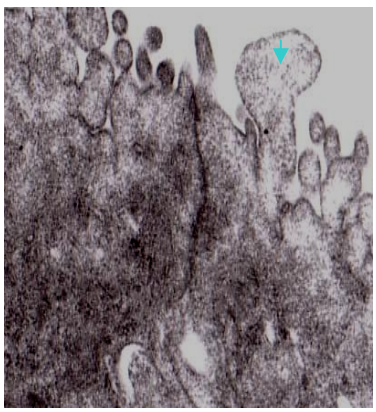
گروه‌های مورد مطالعه (کنترل و آزمایش)	کنترل	شاهد	استروژن	پروژسترون	استروژن + پروژسترون	آنتی پروژسترون + استروژن
تعداد میکروویلی	+++	++	++++	++	++	+++++
بروز پینپود	++	+	+	+ ++	++	-

a

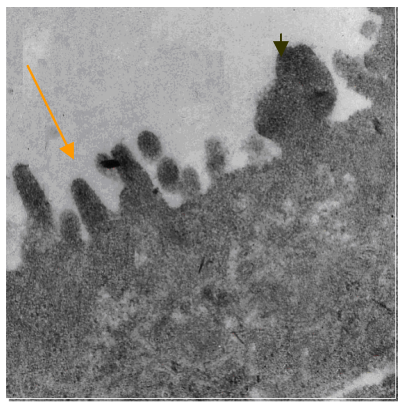
b



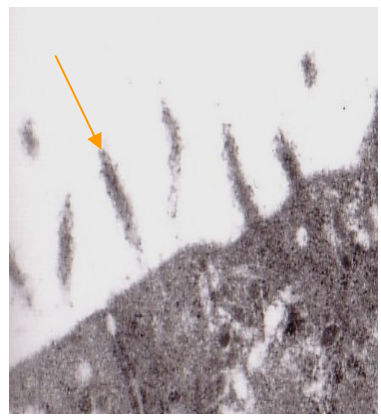
c



d



e



f

تصویر شماره (۱): بررسی فراساختمان اپی تلیوم لومینال آندومتر را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد.

a) گروه کنترل (نوک فلش پینپود را نشان می‌دهد).

b) گروه شاهد (فلش میکروویلی‌ها را نشان می‌دهد).

c) گروه استروژن (به افزایش ارتفاع میکروویلی‌ها توجه نمایید)

d) گروه پروژسترون (به بروز پینپودها توجه نمایید)

e) گروه استروژن + پروژسترون (فلش میکروویلی و نوک فلش پینپود را نشان می‌دهد).

f) گروه آنتی پروژسترون + استروژن (فلش میکروویلی‌ها را نشان می‌دهد).

لازم به ذکر است که بزرگنمایی تصاویر X۲۰۰۰ می‌باشد.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:56 +0330 on Sunday December 24th 2017

یافته‌ها

بررسی غشاء سلولی اپی تلیوم لومینال آندومتر در گروه کنترل نشان می‌دهد که میکروویلی‌ها کم بوده و تعدادی زوائد بزرگ‌تر از میکروویلی‌ها که به نظر پینپود می‌رسید، دیده می‌شد. هسته سلول‌ها به صورت کشیده و در ناحیه قاعده سلول‌ها قرار داشت. واکوئل‌ها به وفور در داخل سیتوپلاسم رأسی سلول‌ها دیده می‌شد (تصویر ۱-a). مطالعه فراساختمان اپی تلیوم لومینال گروه شاهد نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل از تعداد و ارتفاع میکروویلی‌ها کاسته شده و در بعضی از قسمت‌ها پینپودها نیز دیده می‌شد (تصویر ۱-b).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می دهدکه در گروه پروژسترون میکروویلی‌های سطح سلولی کاهش یافته و سطح سلول از یک نامنظمی برخوردار بود. پینپودها در بعضی از مناطق سطح سلولی دیده می‌شد. هسته‌ی سلول‌ها به صورت پهن بوده و گرانول‌های الکترودنس فراوان در ناحیه زیر هسته دیده می‌شد (تصویر ۱-c).

بررسی فراساختمان اپی تلیوم لومینال گروه استروژن نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل تعداد میکروویلی‌ها خیلی زیاد و ارتفاع آن‌ها بلند بود و از تعداد پینپودها نیز کاسته شده بود. هسته سلول‌ها بیضی و تعدادی وزیکول پینوسیتیک با اندازه کوچک در سیتوپلاسم سلول‌ها دیده می‌شد (تصویر ۱-d).

در گروه استروژن + پروژسترون ارتفاع میکروویلی‌ها در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. سطح سلولی در بعضی از قسمت‌ها صاف و زوائد پینپودی نیز مشاهده می‌شد. هسته سلول‌ها بیضی و یوکروماتین بود. تعدادی وزیکول پینوسیتیک با اندازه کوچک در سیتوپلاسم سلول دیده می‌شد (تصویر ۱-e).

نتایج به دست آمده در گروه آنتی پروژسترون همراه با استروژن نشان می‌دهد بود که وزیکول‌های پینوسیتیک زیادی در سیتوپلاسم راسی سلول‌ها دیده می‌شد. سطح سلولی حاوی میکروویلی‌هایی با ارتفاع زیاد بود به طوریکه در مقایسه با سایر گروه‌ها ارتفاع میکروویلی‌ها افزایش یافته بود. علاوه بر آن میتوکندری های زیادی در سیتوپلاسم راسی سلول‌ها دیده می‌شد. اتصالات بین سلولی به ویژه دسموزوم ها به خوبی قابل تشخیص بود (تصویر ۱-f).

بحث و نتیجه گیری

مطالعات نشان می‌دهد که لانه گزینی بلاستوسیست در انسان تحت کنترل هورمون‌های استروئیدی است. به‌طوری‌که در تحریک تخمدانی توسط گنادوتروپین‌ها زمان پنجره لانه گزینی زودتر از موعد روی می‌دهد و در سیکل‌های القاء شده با ART (گنادوتروپین‌ها و هورمون درمانی) این زمان با تاخیر بروز خواهد کرد (۱۲). Tavanitos و همکارانش با ارزیابی توام هورمونی و هیستولوژیکی نشان دادند که سیکل‌های تحریک تخمک‌گذاری باعث رسیدگی زودرس آندومتر و اختلال در لانه گزینی می‌شود (۱۳). همچنین Nikas و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که تحریک تخمک‌گذاری در زنان موجب عدم همزمانی تکامل رویان و رسیدگی آندومتر و نیز موجب کاهش میزان لانه گزینی می‌گردد(۱۴). یافته‌های مطالعات ذکر شده در تایید یافته‌های مطالعه ما هستند. نتایج بدست آمده از این تحقیق در گروه پروژسترون نشان داد که در مقایسه با سایر گروه‌ها تعداد پینپودها افزایش یافته بود. Stavreus نیز در سال۲۰۰۱ نشان داد که تشکیل پینپودها در آندومتر انسان وابسته به غلظت پروژسترون و رسپتورهای آن می‌باشد(۴). درحالی‌که مطالعه انجام گرفته توسط obrna و همکارانش در سال ۲۰۰۴ نشان داد که پروژسترون درمانی در زنان تاثیری در زمان بروز پینپودها ندارد(۶). به طوری‌که تزریق آنتی‌پروژسترون به محیط کشت حاوی سلول‌های اپی تلیالی آندومتر موجب کاهش بروز پینپودها می‌گردد(۱۵).

بررسی فراساختاری اپی تلیوم لومینال آندومتر در گروه‌های استروژن و آنتی پروژسترون همراه با استروژن نشان داد که استروژن نقش اساسی در افزایش طول و تعداد میکروویلی‌ها دارد. مطالعات انجام شده در میمون رزوس و موش‌ها نشان می‌دهد که تزریق آنتی پروژسترون موجب کاهش رشد و نمو جنین مخصوصاً در اوایل حاملگی می‌گردد. به‌طوری‌که تزریق آنتی‌بادی منو کلونال بر علیه پروژسترون موجب توقف رشد جنین در موش می‌شود (۱۶).

همچنین استفاده از این دارو در میمون در مراحل اولیه فاز لوتئال باعث اختلال عمل آندومتر و مهار لانه گزینی می‌شود (۱۷). یافته‌های مطالعات ذکر شده در تایید یافته‌های مطالعه ما می‌باشد.

گرچه اختلاف زیادی در لانه گزینی و اعمال پینپودها در موش و انسان وجود دارد نتایج موجود حاکی از آن است که طول عمر پینپودها کوتاه بوده و با تحریک تخمک‌گذاری می‌تواند تغییر یابد و این تغییر می‌تواند بر رسیدگی آندومتر تاثیر گذارد (۱۴) نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بروز پینپودها در طول پنجره لانه گزینی ما بین گروه‌های کنترل و آزمایش متفاوت است به طوریکه استروژن باعث کاهش بیان پینپودها و پروژسترون موجب افزایش آن می‌شود و این بیانگر آن است که بروز پینپودها وابسته به هورمون‌های استروژن و پروژسترون می‌باشد.همچنین یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که پروژسترون درمانی موجب ظهور گرانول‌های الکترون دنس در ناحیه زیر هسته سلول‌های اپی تلیوم لومینال می‌گردد که احتمالا فعالیت سلول‌های اپی تلیوم لومینال را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:56 +0330 on Sunday December 24th 2017

نتیجه گیری کلی: با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه و مطالعات قبلی انجام گرفته در این زمینه (۱۸، ۱۹، ۲۰) تزریق پروژسترون به تنهایی نمی‌تواند محیط مناسبی را برای لانه‌گزینی بلاستوسیت فراهم نماید. این مطالعه، تجویز استروژن همراه با پروژسترون را در چرخه‌های تحریک تخمک‌گذاری برای لانه‌گزینی پیشنهاد می‌کند.

References:

1. Harper MJK. The implantation window. Bailliere's Clin Obstet Gynecol 1992; 6(2): 351-70.
2. Huet H, Dey SK. Requirement for progesterone priming and its long-term effects on implantation in the mouse. Proc Soc Exp Biol Med 1990; 193: 259-63.
3. Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. Am J Anat 1973; 138: 277-300.
4. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. Fertil Steril 2001; 76: 782-91.
5. Quin C, Ryan E, Claessenes E, Greenblatt E. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. Fertil Steril 2007; 87 (5): 1015-21.
6. Obrna I, Novotny R, Brezinova J, Petrova P, Lichnovsky V, Fingerova H. Changes in the development of uterin pinopod in steroid hormone supplemented cycle. Physiol Res 2004; 53 (4): 423 - 9.
7. Hosie MJ, Murphy CR. A scanning and light microscope study comparing the effects of clomiphene citrate, estradiol 17-B and progesterone on the structure of uterine luminal epitelial cells. Eur J Mor 1995; 33 (1): 39-50.
8. Simon C, Dominguez F, Valbuena D, Pellicer A. The role of estrogen in uterine receptivity and blastocyst implantation. Endocrinol Metab 2003; 14(5): 197-9.
9. Hubayter ZR, Muasher SJ. Luteal supplementation in in vitro fertilization: more questions than answers. Fertil Steril 2008; 89 (4): 749-58.
10. Lindhard A, Bentin-Le. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. Fertil Steril 2002; 78: 221-33.
11. Proctor A, Hurst S, Marshburn P, Matthews M. Effect of progesterone supplementation in early pregnancy on the pregnancy outcome after in vitro fertilization. Fertil Steril 2006; 85 (15): 1550- 2.
12. Nikas G, Garcia V, Pellicer A, Simon C. Assessment of uterine receptivity and timing of embryo transfer using the detection of pinopodes. Hum Reprod 1997;12 (l): 60-9.
13. Tavaniotou A, Smitz J, Bourgain C, Devroey P. Ovulation induction disrupts luteal phase function. Ann N Y Acad Sc 2001; 943:55-63.
14. Nikas G, Develioglu O, Toner J, Jones J. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. Hum Reprod 1999; 14: 787-92.
15. Petersen A, Bentin-Ley U, Ravn V, Qvortrup K, Sørensen S, Islin H. The antiprogesteronn org 31710 inhibits human blastocyte - endometrial interaction in vitro. Fertil Steril 2005; 83(4): 1255-63.
16. Ghosh D, Lalitkumar P, Viviana J, Hendrickx A, Jayasree S. Preimplantation embryo morphology following early luteal phase anti-nidatory treatment with mifepristone (RU486) in the rhesus monkey. Hum Reprod 2000; 15 (1): 180-8.
17. Moulton B, Motz J, Serdoncillo C, Akcali K, Akhan S. Progesterone withdrawal and RU-486 treatment stimulate apoptosis in specific uterine decidual cells. Cell Death Differ 1997 ; 4(1): 76-81.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:56 +0330 on Sunday December 24th 2017

18. Niknafs B, Afshari F. Effects of estrogen and progesterone on endometrial glycocalyx expression in superovulated mice in the implantation window time. Iran J Endocrinol Metab 2009; 10(6): 639-46.
19. Niknafs B, Afshari F, Dezfulian A. Morphological and morphometrical changes of endometrium after application of estrogen and progesterone during luteal phase in the superovulated mice. Iran J Reprod Med 2008: 6 (3): 133-40.
20. Niknafs B, Afshari F, Dezfulian A. The effect of different luteal support hormones on endometrial thickness in superovulated mice. Iran J Reprod Med 2010; 8(1): 18-23.