کاهش باروری در موش آزمایشگاهی تحت تأثیر تزریق داخل رحمی مایع فولیکولی

مریم کبیر سلمانی M.Sc.☆♦، احمد حسینی Ph.D.☆، محمد حسین نصر اصفهانی Ph.D.☆، تقی الطریحی Ph.D.☆، مجتبی رضازاده Ph.D.☆، علی پوراحمدی D.V.M.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

☆ گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

★ مؤسسه سرم و واکسن رازی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر مایع فولیکولی فعال بر روند لانه‌گزینی جنین موش کوچک آزمایشگاهی به‌عنوان یک روش جلوگیری از بارداری

* **مواد و روشها:** ۲۲۶ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده از نژادهای NIH و NMRI پس از جفت گیری و مشاهده پلاک واژن به‌طور تصادفی در سه گروه آزمایش، دارونما (Placebo) و کنترل تقسیم‌بندی شدند. در روز چهارم بارداری، پس از بیهوشی در گروه آزمایش، مایع فولیکولی فعال و فیلتره شده انسان و در گروه دارونما Ham's-F10 از طریق واژینال به داخل شاخهای رحمی تزریق شد. در گروه کنترل نیز تزریق انجام نشد. پس از مراقبت از حیوانات در قفسهای جداگانه در طول دوره بارداری، تعداد موالید و در صد بارداری در هر یک از گروهها در هر نژاد محاسبه و مورد پردازشهای آماری قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از آزمونهای آماری نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری در تعداد موالید بین گروههای آزمایش در مقایسه با گروههای دارونما و کنترل بود ($P<0.05$) در حالی‌که تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین گروههای کنترل و دارونما مشاهده نشد. درصد بارداری نیز در گروه آزمایش اختلاف معنی‌داری با گروههای کنترل و دارونما داشت ($P<0.001$).

* **نتیجه‌گیری:** تزریق داخل رحمی مایع فولیکولی می‌تواند تأثیر منفی بر لانه‌گزینی جنین موش کوچک آزمایشگاهی داشته باشد و در نتیجه موجب کاهش درصد بارداری و تعداد موالید در آن شود. تأثیر منفی مایع فولیکولی بر لانه‌گزینی می‌تواند در نتیجه اختلال در پذیرش اندومتر در زمان باز بودن پنجره لانه‌گزینی یا ایجاد اشکالی در روند تکامل جنین قبل از لانه‌گزینی باشد. مکانیسم دقیق نحوه تأثیر مایع فولیکولی بر لانه‌گزینی بررسی و در خصوص شناخت جزء موثر آن در دست مطالعه است.

گل واژگان: لانه‌گزینی، مایع فولیکولی، جلوگیری از بارداری

مقدمه

جلوگیری از لقاح[1]، ممانعت از لانه گزینی[2] و سقط جنین[3] از راههای اصلی کنترل بارداری در جوامع مختلف به‌شمار می‌روند (۱). با توجه به عدم اطمینان کافی و عوارض سوء جانبی روشهای کنتراسپتیو، خطرات و غیراخلاقی بودن روشهای سقط جنین؛ امروزه توجه محققین بیش از پیش به مطالعه روشهای جلوگیری از لانه گزینی و عوامل مؤثر بر لانه گزینی معطوف شده است (۲، ۳، ۴).

لانه گزینی جنین موش شامل مراحل پیش‌رونده و مرتبطی است که لازمه آن همکنشی[4] بین بلاستوسیست مهاجم و اندومتر پذیرنده است (۵). ارتباط دو طرفه بین این دو ارگانیسم که از نظر ایمونولوژی و ژنتیکی با یکدیگر تفاوت دارند در سه حالت تقابل، اتصال و تهاجم صورت می‌پذیرد (۶) که طی آن بلاتوسیست پس از شناسایی محل لانه گزینی و جهت‌گیری مناسب، ارتباط و تماس مستقیمی با اپیتلیوم‌اندومتر برقرار می‌سازد و در نهایت به داخل آن نفوذ نموده و با تخریب غشای پایه در مجاورت با استروما و عروق خونی رحمی قرار می‌گیرد (۷).

وقایع فوق می‌تواند در محدوده زمانی کوتاهی از سیکل رحمی اتفاق بیافتد که در آن زمان رحم تحت تاثیر هورمونهای استروئیدی، برخی مولکولهای چسبنده ویژه، سیتوکائین‌ها، فاکتورهای رشد و پروتئینازهای تهاجمی دچار تغییرات مورفولوژیک، هیستولوژیک و بیوشیمیایی خاصی می‌شود و آن را پذیرای لانه گزینی بلاستوسیست می‌نماید. به این دوره کوتاه پذیرش رحم، پنجره لانه گزینی[5] گفته می‌شود (۸).

مایع فولیکولی انسان به‌عنوان یک منبع سرشار از آنزیمهای پروتئولیتیک (۹) بر روی لانه گزینی موش بزرگ آزمایشگاهی (۱۰) و موش کوچک آزمایشگاهی (۱۱) در تحقیقات اخیر انجام شده و تأثیر منفی خود را نشان داده است. در این بررسی تأثیر مایع فولیکولی فعال فیلتر شده انسان بر گونه‌های دیگری از موش کوچک آزمایشگاهی بررسی شده است. هدف از تکرار آزمایش روی حیوانات آزمایشگاهی مختلف تأیید نتایج قبلی و یافتن مدل حیوانی مناسبتر برای مطالعات بعدی است.

مواد و روشها

به منظور بررسی تأثیر مایع فولیکولی بر درصد بارداری در شرایط *in vivo* ۱۱۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده ۶-۲ ماهه از نژاد NIH و ۱۱۶ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده ۶-۲ ماهه از نژاد NMRI در موسسه واکسن و سرم سازی رازی (حصارک کرج) تهیه و برای سازگاری با محیط در شرایط استاندارد از نظر سیکل نوری (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شد. موشهای ماده به نسبت ۴ به ۱ به مدت یک شب با موشهای نر بالغ هم نژاد خود هم قفس شده و پس از جفت‌گیری صبح روز بعد برای مشاهده پلاک واژن بررسی شدند. روز مشاهده پلاک واژن به عنوان روز نخست بارداری تلقی شد. موشهای ماده پلاک مثبت در قفسهای جداگانه به‌طور تصادفی در سه گروه آزمایش دارونما و کنترل تقسیم شدند. در روز چهارم بارداری در گروه آزمایش مایع فولیکولی فعال و فیلتر شدهٔ انسان از طریق واژینال به داخل شاخهای رحمی و در گروه دارونما در روز مشابه، محیط Ham's-F10 از طریق واژینال تزریق شد. روش تزریق در هر دو گروه بدین صورت بود که Cut dow tube در اندازه مناسب از یک انتها به سرنگ حاوی محلول مورد نظر وصل و انتهای دیگر آن از طریق واژینال به سمت شاخهای رحمی هدایت شد. سپس به تدریج ۰/۲ سی‌سی از ماده محتوی سرنگ به داخل رحم تزریق گردید. لازم به ذکر است که قبل از شروع، حیوان توسط دی‌اتیل‌اتر به روش استنشاقی بیهوش و پس از تزریق به مدت ۵ دقیقه به حالت وارونه نگاه داشته شد.

مایع فولیکولی از خانمهایی که به منظور درمان نازائی به روش IVF-ET در پژوهشکده رویان مورد آسپیراسیون فولیکولی قرار گرفته بود تهیه شد. نمونه‌های فاقد خون بلافاصله در لوله‌های استریل ریخته شده و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون به دمای ۲۰°- سانتی‌گراد برای نگهداری و یا ۴°- سانتی‌گراد برای استفاده سریع انتقال یافت.

در گروه دارونما از محیط Ham's-F10 برای تزریق به داخل شاخهای رحم استفاده شد. علت انتخاب این محلول بدان دلیل بود که محیط Ham's-F10 از نظر ترکیبات یونی، pH و خواص فیزیکی شباهت زیادی به مایع فولیکولی دارد؛ در حالی که فاقد هر گونه آنزیم است. برای ساخت محیط Ham's-F10، ۷۵ میلی گرم پنی سیلین و ۷۵ میلی گرم استرپتومایسین را در یک ظرف مندرج حاوی ۹/۸۸ گرم پودر Ham's-F10 ریخته و به آن ۲۵۰ سی‌سی آب آنالار استریل افزوده شد تا محلول استوک تهیه شود.

با افزودن بی‌کربنات سدیم و لاکتات کلسیم محلول کاری تهیه شد. پی از طی دوران بارداری، در روز نخست زایمان، تعداد موالید شمارش شد و میانگین تعداد موالید و همچنین درصد بارداری در گروههای مختلف از هر دو نژاد محاسبه شد. با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه میانگین تعداد موالید و از روش آزمون χ^2 درصد بارداری بین گروههای مختلف مقایسه شد.

یافته‌ها

در نژاد NIH مقایسه نتایج حاصل از آزمونهای آماری نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین تعداد موالید در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل و همچنین گروه آزمایش در مقایسه با گروه دارونما بود ($P<0.05$). براساس این نتایج اختلاف معنی‌داری بین گروههای دارو نما و کنترل وجود نداشت (جدول ۱).

1. Contraception
2. Interception
3. Abortion
4. Interaction
5. Implantation window

جدول ۱: آنالیز واریانس میانگین تعداد موالید در روز چهارم بارداری گروه NIH

مشاهدات	گروه دارو نما	گروه آزمایش	گروه کنترل
تکرار	۳۵	۳۴	۴۷
تعدادموشهای‌حامله	۲۳	۱۲	۳۹
تعداد موالید	۱۸۱	۷۳	۲۶۹
میانگین	۵/۶۶	۲/۲۸	۵/۸۵
انحراف معیار	۴/۰۴	۳/۴۳	۳/۰۸

در صد بارداری در نژاد NIH اختلاف معنی داری ($P<0.001$) را بین گروههای آزمایش و کنترل ($\chi^2=۱۸/۶۴$) نشان داد. بین گروههای آزمایش و دارونما نیز اختلاف معنی داری ($P<0.01$) از نظر آماری مشاهده شد ($\chi^2=۷/۶۳$). اختلاف معنی داری در درصد بارداری بین گروههای کنترل دارو نما وجود نداشت ($\chi^2=۱/۹۳$) .

در نژاد NMRI پردازشهای آماری نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین تعداد موالید در گروههای آزمایش در مقایسه با گروه کنترل و دارو نما بود ($P<0.05$). آزمونهای آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و دارو نما نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۲: آنالیز واریانس میانگین تعداد موالید در روز چهارم بارداری گروه NMRI

مشاهدات	گروه دارو نما	گروه آزمایش	گروه کنترل
تکرار	۳۵	۳۴	۴۷
تعداد موشهای‌حامله	۲۷	۱۵	۳۸
تعداد موالید	۲۸۲	۱۳۱	۳۲۶
میانگین	۸/۰۶	۴/۱۵	۶/۹۴
انحراف معیار	۵/۲۲	۵/۰۶	۴/۱۷

مقایسه درصد بارداری در نژاد NMRI بین گروههای آزمایش و کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($\chi^2=۱۱/۷۷$)($P<0.001$). بین گروههای آزمایش و دارونما نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($\chi^2=۷/۹$)($P<0.01$) . اما بین گروههای کنترل و دارونما در این نژاد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($\chi^2=۰/۱۷$).

بحث

اندومتر رحم در مرحله پذیرندگی[1] که همزمان با باز بودن پنجره لانه‌گزینی است دچار تغییرات مختلفی می‌شود که مهمترین آنها کاهش شارژ الکترونگاتیو سطحی (۱۲)، کاهش ضخامت گلیکوکالیکس (۱۳)، کوتاه شدن، سپس پهن و ناپدید شدن میکروویلی‌های سطحی اپیتلیوم‌مجرائی (۱۵)، ظهور اسپتورهای سطحی خاص نظیر رسپتورهای هپارین سولفات پروتئوگلیکان (۱۶) و ... است.

مایع فولیکولی حاوی آنزیمهای مختلف از جمله پلاسمین و آنزیمهای ماتریکس متالوپروتئیناز‌ها است (۱۷) که قادر به تجزیه لامینین، فیبرونکتین، پروتئوگلیکانها و کلاژن نوع IV هستند (۱۸، ۱۹). تروفوبلاست به وجود لامینین و کلاژن نوع IV برای اتصال به اندومتر و تمایز نیاز دارد (۲۰، ۲۱) و لذا تجزیه این موارد در زمانی نزدیک به شروع لانه‌گزینی می‌تواند مانع از تمایز تروفوبلاست شده و از اتصال آن به اندومتر جلوگیری نماید.

ایجاد کمپلکس بین گیرنده‌ها بنا اینتگرین سطح سلولهای تروفوبلاست با گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح سلولهای اندومتر یکی از وقایع ضروری در مرحله اتصال لانه‌گزینی است که موجب تحریک ترشح کلاژناز فعال توسط سلولهای تروفوبلاست می‌شود.

در صورت نابود شدن این گیرنده‌ها یا کاهش گلیکوپروتئین‌ها تحت‌تأثیر آنزیمهای موجود در مایع فولیکولی، کمپلکس مزبور پدید نیامده و عدم ترشح کلاژناز یا غلظت پایین آن سبب عدم نفوذ تروفوبلاست به اپیتلیوم‌رحمی می‌شود و بدین ترتیب در مرحله تهاجمی لانه‌گزینی نیز اختلال ایجاد می‌شود (۲۳).

تأثیر منفی مایع فولیکولی فعال بر رشد جنینهای قبل از لانه‌گزینی در مطالعات مختلفی گزارش شده است (۲۵،۲۴). با بلوغ فولیکولهای تخمدانی، سلولهای گرانولوزا فاکتور پروتئینی باز دارنده رشدی به داخل مایع فولیکولی ترشح می‌نمایند که احتمالاً از بلوغ زودرس اووسیت ممانعت به‌عمل می‌آورد (۲۶) که به نوبه خود می‌تواند از رشد و تکامل طبیعی جنین قبل از لانه‌گزینی جلوگیری نماید. بنابراین به نظر می‌رسد که مایع فولیکولی فعال به واسطهٔ وجود آنزیمهای پروتئولیتیک و فاکتور باز دارندهٔ رشد در آن می‌تواند با ایجاد اختلال در حالت پذیرندگی رحم در زمان باز بودن پنجره لانه‌گزینی و همچنین جلوگیری از رشد طبیعی جنین قبل از لانه‌گزینی مانع از لانه‌گزینی موفقیت آمیز بلاستوسیست شود.

کاهش درصد بارداری و میانگین تعداد موالید تحت تأثیر تزریق مایع فولیکولی فیلتر شده به‌داخل رحم موشهای کوچک آزمایشگاهی از نژاد NIH و NMRI یک روز پیش از شروع لانه‌گزینی، قابل انطباق و تأیید کننده نتایج حاصل از مطالعات پیشین است که روی موش سوری از نژاد Swiss Albino Mice و موش بزرگ آزمایشگاهی از نژاد NMRI و Sprague Dawley انجام شده است. لازم به ذکر است که بررسی تأثیر مایع فولیکولی بر لانه‌گزینی برای اولین بار توسط آقای دکتر نصر و همکاران صورت پذیرفته است.

تقدیر و تشکر

نگارندگان بدینوسیله از همکاریهای آقای منوچهر فضلی از موسسه تحقیقات رازی و همچنین سرکار خانم لیلا کریمیان و آذر عسگریان از پژوهشکده رویان کمال امتنان را ابراز می‌دارند.

References

1. Edward RG: Review of implantation, contraception. Hum Reprod 1994; 6: 955-995

2. Joseph W, Nezam M: Oral contracptive side effects: Where is the beef? Contraception 1995; 52: 327-335

1. Receptivity

3. Braken MB, Oral contraception and congenital malformations in offsprings: a review and meta analysis of prospective studies. Obstest Gynecol 1990; 76: 552-557

4. Nie GY, Butt AR, Salmonsen LA, Findlay TK: Hormonal and non-homonal agents in implantation as targets for contraception. Reprod Fertil Dev 1997; 9: 65-76

5. Klentzeris LD: The role of endometrium in implantation. Hum Reprod 1997; 2: 170-175

6. Simone Vallebuena D: Embryonic implantation. Annal Endocrinol 1999; 60: 134-136

7. Simon C, Martin JC, Galan A, Vallebuena D, Pelcer A: Embryonic regulation implantation. Semin Reprod Endocrinol 1999; 17: 267-274

8. Lopata A: Blastocyst-endometrial interaction: An appraisal of some old and new ideas. Mol Hum Reprod 1996; 2: 519-525

9. Fukumoto M, Yajima Y, Okamura H, Midorika O: Collagenolytic enyzyme activity in human ovary: An ovulation enzyme system. Fertil Stril 1981; 36: 746-750

۱۰. الهام یوسفیان: بررسی اثر مایع فولیکولی انسانی به عنوان یک روش جلوگیری از بارداری. پایان نامه کارشناسی ارشد ۱۳۷۷، دانشگاه تربیت مدرس

۱۱. مریم کبیرسلمانی، احمد حسینی، مجتبی رضازاده، تقی الطریحی، منوچهر فضلی: بررسی تاثیر مایع فولیکولی بر لانه گزینی. نشریه یاخته شماره ۴، صفحات ۱۲-۹، ۱۳۷۸

12. Dender HW: Implantation: a cell biological paradox. J Exp Zool 1993; 266: 541-558

13.Potter SW, Morris JE: Immunouloucalization of heparin sulfate proteoglycans in mouse uterine epithelium. the oestrous cycle dependent changes. J Cell Biol 1986; 111:266

14. Murphy CR, Show TJ: Plasma membrane transformation: A common response of uterine epithlial cell during the peri-implantion period. Cell Biol Inter 1994; 18: 115-1128

15. Psychoyos A, Nikas G: Uterine pinopodes as markers of utrine receptivity. Assist Reprod Rev 1994; 4: 26-32

16. Abrahamsoha PA, Zorn TMT: Implantation and decidualization in rodent. J Exp Zool 1993; 266, 603-628

17. Reich R, Miskin R, Tsafrir A: Follicular plasminogen activator involvement in ovulation in the rat. Endocrinology 1958; 116: 516-512

18. Cury TE, Mann JS, Ests RS, Jones BC: α_2 maroglobailn and tissue inhibitors of metalloproteinases ovaries in human preovalotory. Endorinol 1990; 127:63-69

19. Tabibzadeh S, Babaknia A: The signals and mollecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. Hum Reprod 1995; 10: 1579-1602

20. Kao L, Cattabiano S, Wa Strauss JF, Kilman HY: The human villous cytotrophoblast interaction with extracellular matrix proteinase, endocrine function cytoplasmic differentiation. Dev Biol 1988; 130-693

21. Carson DD, Tang Y, Gray S: Collagenase support, embryo attachment and outgrowth in vitro. Dev Biol 1988; 127: 368-376

22. Hujanen TT, Ronnberg L, Kauppial A, Puistola A: Laminin in the human embryo implantation: analogy to the invasion. Development 1992; 58: 105-113

23. Librach clifford L, Werb Z, Fizgerald ML, Chio K, Corwin NM: 92 KD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblast. J Cell Biol 1991; 113: 437-449

24. Hemming R, Mitron P, Lachapell MH, Ward L, Faccone T, Guyde H: Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embryos. Fertil Strill 1994; 62: 1018-1021

۲۵. عباسعلی کریمپور: اثر مایع فولیکولی انسان و مایع رحمی موش بر رشد و نمو جنینها مرحله قبل از لانه گزینی و محیط آزمایشگاهی *In vitro* پایان نامه دکترای علوم تشریح ۱۳۷۳، دانشگاه تربیت مدرس تهران

26. Hung TT, Millard MM: Inhibition of mouse embryo cleavage by a factor present in the human preovulatory follicular fluoid. J Clin Endocrinol Metab 1985; 61: 899-904