تأثیر تجویز پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری بر فراساختمان آندومتر رحم موش در زمان پیش از لانه‌گزینی

میترا آرین‌منش M.Sc.☆♦، مژده صالح‌نیا Ph.D.☆، بهروز نیک‌نفس Ph.D.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

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

چکیده

* **هدف:** بررسی تغییرات مرفولوژیک و فراساختاری آندومتر رحم موش با تجویز روزانه پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری در زمان پیش از لانه‌گزینی

* **مواد و روشها:** موش‌های بالغ نژاد NMRI با سن ۱۰-۶ هفته، با به‌کارگیری Human Monoposal Gonadotropin (hMG) و Human Chorionic Gonadotropin (hCG) تحریک تخمک‌گذاری شده و سپس روزانه مقدار یک میلی‌گرم به ازای هر موش، پروژسترون به شکل زیرپوستی تزریق شد و به شکل مصنوعی تلقیح شدند. ۳/۵ روز پس از تلقیح، جانوران با جابه جایی مهره‌های گردنی کشته شده و نمونه بافتی از یک سوم میانی هر یک از شاخهای رحمی برداشت شد. گروههای شاهدنیز در دو حالت لقاح طبیعی و لقاح مصنوعی مشابه با گروه تجربی نمونه‌برداری شدند. نمونه‌های بافتی برداشت شده جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری با رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS)، هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) و میکروسکوپ الکترونی، پاساژ داده شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** نتایج تحقیق حاضرنشان داد که در مقایسه با گروههای شاهد، تجویز پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری موجب کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم شد. افزایش گرانولهای چربی در قاعده سلولهای اپی‌تلیوم سطحی و غددی در گروه تجربی دیده شد. فضای بین سلولی در گروه تجربی کم بوده و به نظر می‌رسید که واکنش دسیدوایی قابل ملاحظه‌ای رخ نداده بود.

* **نتیجه‌گیری:** در مجموع به نظر می‌آید که تجویز پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری تغییراتی را در آندومتر ایجاد کرده که احتمالاً نمی‌تواند شرایط مناسبی را برای پذیرش جنین فراهم آورد. بخصوص که واکنش دسیدوایی زودرس و مناسب، صورت نپذیرفته بود که در این خصوص نیاز به مطالعات بیشتر است.

گل‌واژگان: آندومتر، لانه‌گزینی، تحریک تخمک‌گذاری، فراساختمان

مقدمه

لانه‌گزینی موفق به کیفیت جنین و پذیرندگی آندومتر وابسته است. اما میزان مشارکت آندومتر در موفقیت لانه‌گزینی ناشناخته بوده و هنوز معیار مشخصی جهت ارزیابی پذیرندگی آندومتر وجود ندارد.

آمادگی آندومتر جهت پذیرش بلاستوسیست تحت کنترل هورمونهای استروئیدی است (۱). پروژسترون از جمله هورمونهایی است که در ایجاد آمادگی رحم جهت پذیرش بلاستوسیست در زمان لانه‌گزینی، مؤثر است. با تأثیر پروژسترون وزیکولهای سیتوپلاسمیک، میتوکندریهای غول‌پیکر، اتصالات محکم و منفذدار سلولهای اپی‌تلیال آندومتر و فعالیت غدد رحمی افزایش می‌یابد (۲، ۳، ۴).

در سیکلهای IVF جنین در مرحله ۱۲ - ۴ سلولی در روزهای ۱۹ - ۱۷ سیکل به رحم فرد منتقل می‌شود، در حالی که در سیکل طبیعی، لانه‌گزینی جنین در مرحلهٔ بلاستوسیست در طول روزهای ۱۹ تا ۲۱ سیکل صورت می‌گیرد. بنابراین اختلاف زمانی حدود ۲ الی ۳ روز در زمان لانه‌گزینی مابین سیکلهای تحریک شدهٔ IVF و سیکل طبیعی وجود دارد (۵).

تحقیقات Hosie در سال ۱۹۹۵ نشان داد که تزریق ۵mg پروژسترون به مدت سه روز متوالی در رتهایی که تخمدانهایشان برداشته شده بود موجب رشد پینوپدها، افزایش قطرات ترشحی و ظهور میکروویلیهای کوتاه در سطح سلول شد (۶).

Risek نیز در سال ۱۹۹۵ با تجویز ۲ mg پروژسترون به رتهای نابالغ هر ۱۲ ساعت یک بار به بررسی آندومتر رحم پرداخت و نتیجه گرفت که تزریق پروژسترون موجب کوتاه شدن طول اپی‌تلیوم و پیدایش اتصالات منفذدار در شروع فاز ترشحی می‌شود (۴).

در سالهای ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷ ، Kramer و همکارانش پی بردند که تحریک تخمک‌گذاری باعث کاهش گلیکوکالیکس پوشانندهٔ غشای رأسی سلولهای اپی‌تلیال و نیز کاهش نفوذپذیری عروق آندومتر می‌شود (۷، ۸).

Ertzeid و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که تحریک تخمک‌گذاری موجب کاهش لانه‌گزینی و تکوین جنینها و نیز کاهش وزن جنینهای حاصل از تحریک تخمک‌گذاری می‌شود (۱). در حالی که Levi و همکارانش در همان سال اعلام کردند که تحریک تخمک‌گذاری اثر زیان‌آوری بر روی پذیرندگی آندومتر و میزان لانه‌گزینی ندارد (۹).

بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده ضروری به نظر می‌رسید که تأثیرات تحریک تخمدانی به همراه تجویز روزانهٔ پروژسترون بر فراساختمان آندومتر رحم موش در زمان قبل از لانه‌گزینی مورد ارزیابی بیشتر قرار گیرد. بدین منظور، در این تحقیق تغییرات مرفولوژیکی و فراساختاری ایجاد شده در آندومتر رحم در زمان قبل از لانه‌گزینی را در مقایسه با گروه شاهد، بررسی کرده تا پاسخ مناسبی به این سؤال داده شود که آیا تجویز پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری می‌تواند شرایط مطلوبی را برای آندومتر، جهت لانه‌گزینی پیش از موعد (Preimplantation) فراهم آورد یا نه؟

مواد و روشها

* الف) نمونه‌های مورد مطالعه

در این تحقیق از موش سوری مادهٔ بالغ نژاد NMRI با سن ۱۰-۶ هفته در دو گروه شاهد و تجربی استفاده شد:

گروه شاهد I: موشهای ماده به منظور جفت‌گیری در مجاورت موشهای نر قرار گرفتند. صبح روز بعد با مشاهدهٔ پلاک واژینال، ۵ سر موش حامله را جداکرده و پس از گذشت ۳/۵ روز (زمان پیش از لانه‌گزینی)، جانوران به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شده و شاخهای رحمی آنها خارج گردید، و یک نمونهٔ بافتی حدود ۳mm از $\frac{1}{3}$ میانی شاخ رحمی به منظور مطالعه میکروسکوپ نوری و نمونهٔ بافتی دیگری به اندازهٔ ۱mm به منظور مطالعهٔ میکروسکوپ الکترونی انتخاب شدند.

گروه شاهد II: ۵ سر موش سوری به روش مصنوعی، به صورت کاذب حامله شدند. برای این منظور یک سواپ را داخل واژن کرده و به این طریق دیوارهٔ آن تحریک گردید. صبح روز بعد به عنوان روز اول حاملگی در نظر گرفته شد. موشهای مورد نظر پس از گذشت ۳/۵ روز مانند گروه شاهد I نمونه‌برداری و مطالعه شدند.

گروه تجربی: ۵ سر موش سوری با استفاده از تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد بین‌المللی هورمون hMG و ۴۸ ساعت پس از آن با استفاده از تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد بین‌المللی هورمون hCG تحریک تخمک‌گذاری شدند. پس از تزریق هورمون hCG موشها به روش مصنوعی حاملهٔ کاذب شده و صبح روز بعد به عنوان روز اول حاملگی منظور شد. ۱۲ ساعت پس از تزریق هورمون hCG روزانه ۱mg پروژسترون به هر موش به صورت زیر جلدی به موشها تزریق شد (۱۰). ۳/۵ روز پس از تزریق هورمون hCG موشها همانند گروههای شاهد نمونه‌برداری و مطالعه شدند.

* ب) مطالعهٔ میکروسکوپ نوری

نمونه‌های بافتی با محلول بوئن به مدت ۲۴ ساعت فیکس شده و پس از آن مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی و قالب‌گیری با پارافین انجام شد. سپس برشهای بافتی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) و پریودیک اسید شیف (PAS) رنگ‌آمیزی شدند.

* ج) مطالعهٔ میکروسکوپ الکترونی

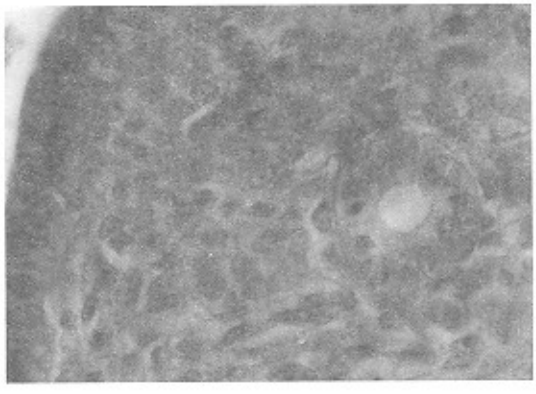
نمونه‌های تهیه شده جهت مطالعهٔ میکروسکوپ الکترونی با گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد به مدت ۱/۵ ساعت فیکس اولیه و با تتراکسیداسمیوم به مدت یک ساعت فیکس ثانویه شدند. پس از آب‌گیری با اتانول و آغشتگی با رزین اپون ۸۱۲ ، قالب‌گیری شد. برشهای نیمه نازک با ضخامت ۵۰۰ میکرون با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو و برشهای نازک به ضخامت ۵۰ نانومتر با رنگ‌آمیزی اورانیل استات و سیترات سرب تهیه شد و سپس گروهها به طور کیفی با یکدیگر مقایسه و بررسی شدند.

یافته‌ها

* مشاهدات میکروسکوپ نوری

الف) گروه شاهد

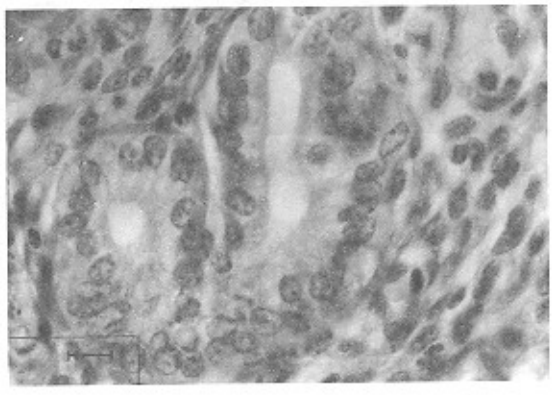
در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین گروه ۳/۵ روزه پس از لقاح طبیعی، ارتفاع اپی‌تلیوم سطحی نسبتاً بلند بوده و استوانه‌ای ساده به نظر می‌رسید. اپی‌تلیوم غددی نسبت به اپی‌تلیوم سطحی، ارتفاع کمتری داشت. مشاهدات برشهای نیمه نازک با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو مشابه با نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین بود. در اپی‌تلیوم سطحی و غددی دو نوع سلول روشن و تیره مشاهده شد. همچنین استروما پر تراکم به نظر می‌رسید. در رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف، مناطق PAS مثبت در سطح فوقانی و سطح تحتانی سلولهای اپی‌تلیال و نیز در استروما، لایه‌ای سلولهای استرومایی مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر آندومتر رحم موش، گروه شاهد ۳/۵ روز پس از لقاح طبیعی، با رنگ‌آمیزی PAS. بزرگنمایی: ۵۵۰×

ب) گروه شاهد II

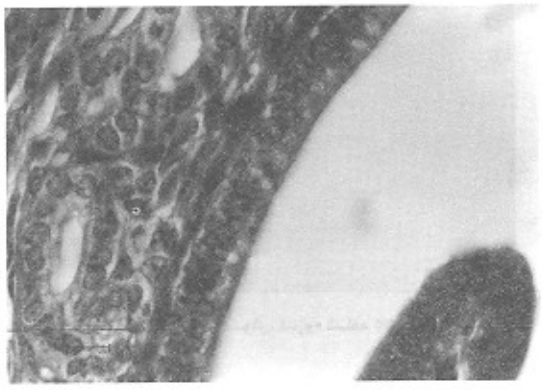
گروه ۳/۵ روزه پس از لقاح مصنوعی، از لحاظ مرفولوژیک شبیه به گروه شاهد I بود (شکل ۲).



شکل ۲: تصویر آندومتر رحم موش، گروه شاهد ۳/۵ روز پس از لقاح مصنوعی، با رنگ‌آمیزی H&E. بزرگنمایی: ۵۵۰×

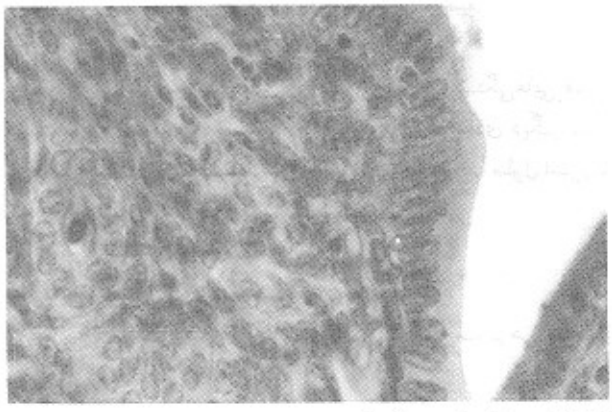
ج) گروه تحریک تخمک‌گذاری به همراه تجویز پروژسترون

در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین ارتفاع اپی‌تلیوم سطحی نسبتاً کوتاه بوده و استوانه‌ای ساده به‌نظر می‌رسید. هستهٔ سلولها کشیده و در قاعدهٔ سلول به صورت منظم قرار داشتند. ارتفاع اپی‌تلیوم غددی کاهش یافته و به حالت استوانه‌ای کوتاه دیده می‌شد (شکل ۳).



شکل ۳: تصویر آندومتر رحم موش، گروه تجربی ۳/۵ روز پس از تحریک تخمک‌گذاری با تجویز پروژسترون، با رنگ‌آمیزی H&E. بزرگنمایی: ۵۵۰×

در برشهای نیمه نازک رنگ‌آمیزی شده با تولوئیدین بلو نتایج مشابه با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین مشاهده شد. گرانولهای کوچک سبزرنگی در سیتوپلاسم قاعده‌ای سلولهای اپی‌تلیوم سطحی و غددی مشاهده شد. همچنین استروما متراکم بوده و سلولهای آن دارای هستهٔ یوکروماتین با ۱ تا ۲ هستک بودند. مشاهدات رنگ‌آمیزی با پریودیک اسید شیف مانند گروههای شاهد به نظر می‌رسید. علاوه بر آن داخل مجرای غددی نیز PAS مثبت بود (شکل ۴).



شکل ۴: تصویر آندومتر رحم موش، گروه تجربی ۳/۵ روز پس از تحریک تخمک‌گذاری با تجویز پروژسترون، با رنگ‌آمیزی PAS. بزرگنمایی: ۵۵۰×

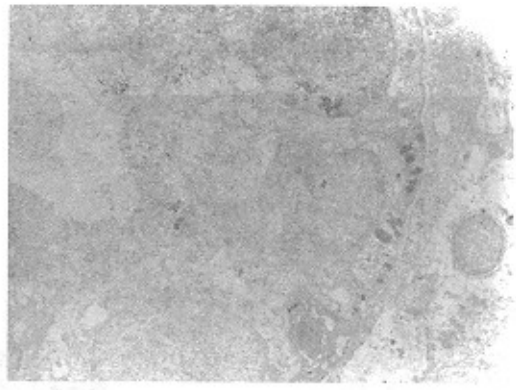
* مشاهدات میکروسکوپ الکترونی

الف) فراساختمان گروه شاهد I

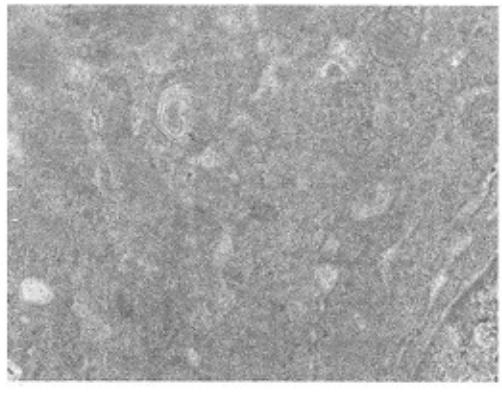
در اپی‌تلیوم سطحی و غددی گروه شاهد ۳/۵ روز پس از لقاح طبیعی، دو نوع سلول روشن و تیره مشاهده شد (شکل ۵).

سلولهای تیره، تراکم سیتوزولی بیشتری نسبت به سلولهای روشن داشتند. در سیتوپلاسم سلولهای تیره تعدادی وزیکول پینوسیتیک، تعداد زیادی پلی‌زوم و RER، میتوکندریهای بیضی شکل و مدور و نیز جسم تیغه‌ای مشاهده شد (شکل ۶) سلولهای روشن نیز دارای هستهٔ

بزرگ و مدور و ارگانلهایی مشابه با سلولهای تیره بودند.



شکل ۵: میکروگراف آندومتر رحم موش، گروه شاهد ۳/۵ روز پس از لقاح طبیعی. بزرگنمایی: ۲۸۵۰۰×

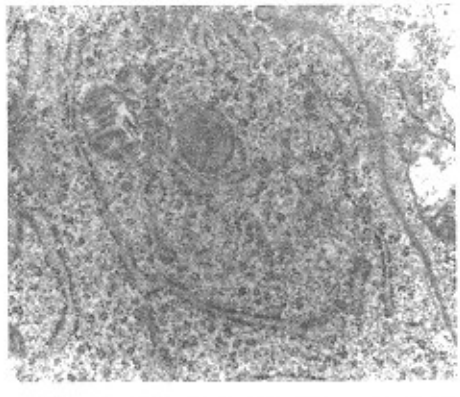


شکل ۶: میکروگراف آندومتر رحم موش، گروه شاهد ۳/۵ روز پس از لقاح طبیعی. بزرگنمایی: ۱۹۰۰۰×

بر روی غشای رأسی سلولهای اپی‌تلیال، برجستگی‌هایی قابل رؤیت بود که تعدادی شبیه به میکروویلی و تعدادی دیگر نیز، برجستگی‌های پهن شده بودند که به نظر پینوپد می‌آمدند. سلول استروما کشیده و دارای هسته مدور تا بیضی یوکروماتین بود.

ب) فراساختمان گروه شاهد II

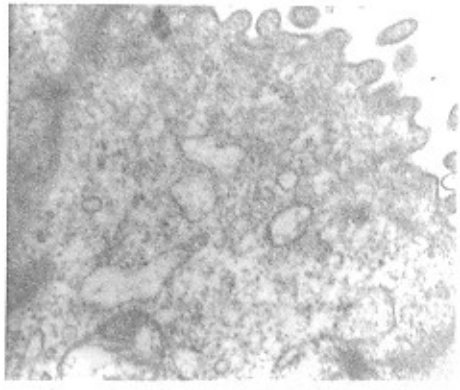
فراساختمان گروه شاهد ۳/۵ روز پس از لقاح مصنوعی همانند گروههای شاهد ابود (شکل ۷).



شکل ۷: میکروگراف آندومتر رحم موش، گروه شاهد ۳/۵ روز پس از لقاح مصنوعی. بزرگنمایی: ۱۹۰۰۰×

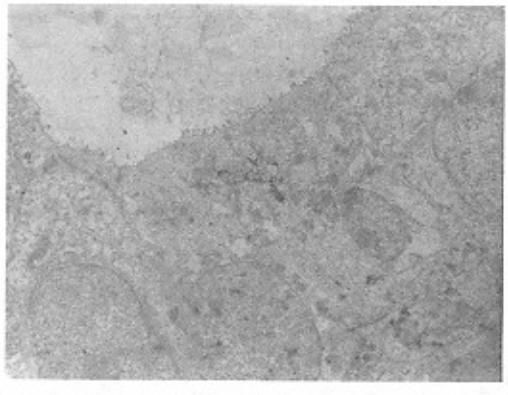
ج) فراساختمان گروه تحریک تخمک‌گذاری به همراه تجویز پروژسترون

در اپی‌تلیوم گروه تجربی دو تیپ سلول با سیتوپلاسم روشن و تیره نمایان بود. برجستگی‌های سطح سلول نسبت به گروه شاهد ابه‌نظر بیشتر می‌رسید (شکل ۸) تعدادی گرانول الکترون دنس در قاعدهٔ سلولها مشاهده شد.



شکل ۸: میکروگراف آندومتر رحم موش، گروه تجربی ۳/۵ روز پس از تحریک تخمک‌گذاری با تجویز پروژسترون. بزرگنمایی: ۲۸۵۰۰×

سلولهای استروما چند وجهی، دارای هسته بیضی و یوکروماتین با یک تا دو هستک بودند و در سیتوپلاسم آنها تعدادی پلی زوم، میتوکندری و جسم تیغه‌ای مشهود بود. این گروه در بقیهٔ موارد نیز مشابه با گروههای شاهد ۳/۵ روزه بود (شکل ۹).



شکل ۹: میکروگراف آندومتر رحم موش، گروه تجربی ۳/۵ روز پس از تحریک تخمک‌گذاری با تجویز پروژسترون. بزرگنمایی: ۱۹۰۰۰×

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تجویز پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری موجب کاهش نسبی ارتفاع اپی‌تلیوم سطحی و غددی می‌گردد. این در حالی است که در موشهای تحریک تخمک‌گذاری ۳/۵ روزه، ارتفاع اپی‌تلیوم به نحو محسوسی افزایش یافته و اپی‌تلیوم سطحی متراکم بوده و نمای مطبق کاذب را نشان می‌داد (۱۱). نتایج مشابهی در خصوص تأثیر پروژسترون بر کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم توسط Risek و Hosie در سال ۱۹۹۵ اعلام شده

است (۴، ۶).

افزایش تراکم سلولی و فقدان واکنش دسیدوایی مناسب در گروه تجربی و نیز در موشهای تحریک تخمک‌گذاری شده، مشاهده شد (۱۱). یافته‌های مشابهی نیز در این زمینه موجود است. Kramer در سال ۱۹۹۷ کاهش واکنش دسیدوایی در رتهای تحریک تخمک‌گذاری شده را در نتیجهٔ کاهش نفوذپذیری عروق دانست (۸).

McRae نیز در سال ۱۹۹۸ اعلام کرد که تشکیل عروق منفذدار تحت کنترل هورمونها است و نشان داد که پروژسترون موجب کاهش نفوذپذیری عروق می‌شود (۱۲). تحقیق حاضر نیز نشان داد که احتمالاً تحریک تخمک‌گذاری حتی با تجویز پروژسترون نمی‌تواند واکنش دسیدوایی مناسب را ایجاد کند، که این امر احتمالاً می‌تواند ناشی از کاهش گیرنده‌های پروژسترون در سیکلهای تحریک تخمک‌گذاری باشد (۱۳) و یا اینکه شاید تحریک تخمک‌گذاری و تجویز پروژسترون در این پروتکل، تغییراتی را در ترشح پروستاگلاندینها ایجاد کرده است که در این زمینه نیاز به تحقیق بیشتری است.

همچنین از تعداد میکروویلی‌های سلولهای اپی‌تلیال آندومتر موشهای تحریک تخمک‌گذاری شدهٔ ۳/۵ روزه کاسته شده بود (۱۱). Kramer در سال ۱۹۹۴ اعلام کرد که ارتباط مستقیمی بین گلیکوکالیکس پوشاندهٔ سطح میکروویلی‌ها و پذیرندگی آندومتر وجود دارد (۷). اگر چه در تحقیق حاضر مطالعهٔ مرفومتریک انجام نشده، اما کاهش گلیکوکالیکس بر سطح میکروویلی‌های گروه تجربی مشاهده شد که این امر احتمالاً می‌تواند تأثیر نامطلوبی بر پذیرندگی آندومتر بگذارد.

گرانولهای چربی فراوانی در سیتوپلاسم قاعده‌ای سلولهای اپی‌تلیال سطحی و غددی مشاهده شد که در گروههای تجربی و نیز در موشهای تحریک تخمک‌گذاری شده (۱۱) نسبت به گروههای شاهد بیشتر بود. این افزایش چربی می‌تواند منتج از دو مسیر باشد: یکی ورود پیش سازهای چربی از جمله اسیدهای چرب و کلسترول به سلول و دیگری به علت بیوسنتز چربی در درون سلول. اما با توجه به اینکه افزایش محسوسی در شبکهٔ آندوپلاسمی صاف در این سلولها مشاهده نشد، لذ. احتمال اول منطقی‌تر به‌نظر می‌رسید.

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که تجویز روزانهٔ پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری موجب تغییرات مرفولوژیک و فراساختاری آندومتر رحم موش در زمان قبل از لانه گزینی می‌شود که احتمالاً این تغییرات می‌تواند بر پذیرندگی آندومتر پیش از موعد در پروتکلهای انتقال جنین تأثیر نامطلوبی داشته باشد، البته در این خصوص انتقال جنین در مرحله بلاستوسیست نسبت به مراحل پایین‌تر توصیه می‌شود.

References

1. Ertzeid G, Storeng R: The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. Hum Reprod 2001; 16(2): 221-225
2. Chauhan SC: Inhibition of progesterone induced development of giant mitochondria in uterine glandular epithelial cells by an antiestrogen in rat. Contracoption 1996; 54(9): 256-264
3. Png FY, Murphy CR: The plasma membrane transformation does not last : Microvilli return to the apical plasma membrane of uterine epithelial cells after the period of uterine receptivity. Eur J Mor 1997; 35(1): 19-29
4. Risek B, Klire F, Philips A, Hohn DW, Gilula NB: Gap junction regulation in the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone. J Cell Sci 1995; 108(3): 1017-32
5. Psychoyos A, Nikas G: Uterine pinopods as markers of uterine receptivity. Rep 1994; 4(1): 26-32
6. 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 epithelial cells. Eur J Mor 1995; 33(1): 39-50
7. Kramer B, Wet GD: Exogenous gonadotropin administration affects the glycocalyx of rat endometrial epithelial cells during the period of implantation. J Assist Reprod Gen 1994; 11(10): 504-509
8. Kramer B: Changes in vascular permeability and deciduoma formation during the pre- implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins. Anat Rec 1997; 247: 20-24
9. Levi AJ, Drews MR, Bergh PA, Bradley TM, Scott RT: Controlled ovarian hyperstimulation does not adversely affect endometrial receptivity in in vitro fertilization cycles. Fertil Steril 2001; 76: 670-674
10. Miller BG: Delayed interactions between progesterone and low doses of 17b-estradiol in the mouse uterus. Endocrinology 1979; 104: 26-33
۱۱. بیگی بروجنی ماندانا: تأثیر تحریک تخمک‌گذاری بر فراساختمان آندومتر در زمان لانه گزینی، پایان‌نامهٔ دورهٔ کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تابستان ۱۳۸۰، صفحهٔ ۶۵-۵۰
12. McRae AC: The blood-uterine barrier and exchange between extracellular fluids. J Reprod Fertil 1988; 82: 857-873
13. Hadi FH, Chantler E, Anderson E: Ovulation induction and endometrial steroid receptors. Hum Reprod 1994; 9: 2405-2410