بررسی مقایسه‌ای تاثیر حاملگی طبیعی و کاذب بر فعالیت ALP تخمدانی موش سوری

هاتف قاسمی‌حمیدآبادی M.Sc.[1]، مژده صالح‌نیا Ph.D.[1*]، سیده‌زهرا بطحایی Ph.D.[2]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی
* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Email: mogdeh@dr.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۹/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۵/۳/۱

* **هدف:** تعیین الگوی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) تخمدان موش پس از تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از (Pregnant Mare Serum Gonadotropin: PMSG) و (human Chorionic Gonadotropin: hCG) نسبت به گروه شاهد طی دوران ابتدای بارداری طبیعی و کاذب

* **مواد و روش‌ها:** تعداد ۲۴۰ سر موش ماده نژاد NMRI با سن بین ۶ تا ۱۰ هفته انتخاب و به صورت تصادفی به دو گروه شاهد و تحریک شده تقسیم شدند. سپس در هر گروه زیرگروه‌های حامله به روش طبیعی و حامله کاذب در نظر گرفته شد. جهت القای حاملگی کاذب از تحریک مکانیکی واژن استفاده شد. روزانه ۵ سر موش به ترتیب از روز اول تا ششم به طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی در هر گروه کشته شدند و به منظور ارزیابی‌های بیوشیمیایی، هر دو تخمدان آنها جدا و پس از هموژن و سانتریفوژ کردن نمونه‌ها (با دور g۱۴۰۰۰) و در معرض قرار دادن سوبسترای پارانیتروفنیل فسفات فعالیت آنزیم تعیین و پس از تعیین مقدار پروتیین، فعالیت ویژه ALP برحسب واحد بر میلی‌گرم محاسبه شد در پایان برای تعیین معنی‌دار بودن اختلافات از آزمون Mann Whithney استفاده شد. در بررسی‌های هیستوشیمیایی یکی از تخمدان‌ها برداشت شد و با استفاده از دستگاه کرایواستات برش‌های به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد و با تکنیک Azo-coupling و سوبسترای آلفا-نفتول فسفات واکنش ALP مورد بررسی قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** الگوی فعالیت ALP در مطالعه هیستوشیمی و بیوشیمی در تمام گروه‌ها کاملا مطابقت داشت. فعالیت ویژه آنزیم ALP تخمدان در گروه‌های شاهد و تحریک شده حامله به روش طبیعی روند افزایشی داشت و مقایسه آن در دو گروه مذکور نشان داد که در گروه تحریک شده از روز دوم تا پنجم نسبت به گروه شاهد افزایش و در روز اول و ششم کاهش داشت و این تغییرات به جز روزهای اول و چهارم از لحاظ آماری معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بود. همچنین در گروه شاهد حامله کاذب در مقایسه با گروه شاهد حامله طبیعی فعالیت آنزیم کمتر و اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تمام روزها وجود داشت. در گروه تحریک شده حامله کاذب فعالیت ALP تا روز دوم افزایش و پس از آن کاهش داشت و در مقایسه با گروه شاهد حامله کاذب در تمامی روزها به غیر از روز ششم تفاوت معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). مقایسه گروه تحریک شده و حامله طبیعی و تحریک شده حامله کاذب حاکی از آن بود که فعالیت آنزیم در گروه حامله به روش طبیعی بیشتر از گروه حامله کاذب بود و اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تمام روزها وجود داشت.

* **نتیجه‌گیری:** در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد تحریک تخمک‌گذاری سبب تغییر در الگوی فعالیت آنزیم ALP تخمدان طی حاملگی اولیه و در زمان نزدیک به لانه‌گزینی می‌شود که موید نقش این آنزیم در فرآیندهای متابولیکی تخمدان و استرویید‌سازی است. هرچند که به مطالعات بیشتری در این خصوص با استفاده از تکنیک‌های دیگر نیاز است.

کلیدواژگان: آنزیم آلکالین فسفاتاز، تحریک تخمک‌گذاری، تخمدان، حاملگی کاذب

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۱، بهار ۸۵، صفحات ۵۹-۵۳

مقدمه

آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) یک گلیکوپروتیین سطح سلول است که در هیدرولیز استرهای خارج سلولی نقش دارد و به‌طور گسترده‌ای در تمام بافت‌های مهره‌داران از جمله ارگان‌های تناسلی نظیر تخمدان یافت می شود (۱، ۲، ۳) و می‌تواند با انتقال کربوهیدرات‌ها، پروتیین‌ها و اسیدهای آمینه در تکوین و بلوغ فولیکول‌ها و فرآیندهای متابولیکی تخمدان موثر باشد (۴، ۵، ۶).

آنزیم آلکالین فسفاتاز با نقش انتقالی و دفسفوریله کردن ترکیبات، می‌تواند در فرآیند استرویید‌سازی کمک کند (۷، ۸). افزایش فعالیت آنزیم در سلول‌های تکا، که با زمان لانه‌گزینی جنین همزمان است، به علت حداکثر فعالیت استرویید‌سازی تخمدان است. در واقع

هورمون‌های استرووییدی می‌توانند سبب افزایش فعالیت ALP تخمدان شوند (۹). در زمینه تاثیر هورمون‌های جنسی بر فعالیت این آنزیم، هنسل و همکاران نشان دادند فعالیت ALP در مایع فولیکولار تخمدان موش بعد از به کارگیری گنادوتروپین‌ها، اگزوژنوس‌های نظیر hCG یا LH افزایش می‌یابد (۱۰).

همچنین ون‌کمپن نشان داد فعالیت ALP در مایع فولیکولار گاو تحریک به تخمک‌گذاری شده، با hCG نسبت به گروه کنترل افزایش داشت و مشخص شد که غلظت بالای گنادوتروپین‌ها ممکن است افزایش فعالیت ALP فولیکولی را موجب شود (۱۱).

گودی و همکاران نیز ثابت کردند بین فعالیت ALP و تولید استرووییدها در تخمدان‌های گاو رابطه است (۱۲). آنها اظهار داشتند فعالیت ALP باعث غیرفعال شدن رسپتور استرووییدها می‌شود و فعالیت ALP با پروژسترون، آندروستندیون، دهیدرواپی آندروسترون و تستوسترون رابطه فیدبکی مثبتی دارد اما با استرادیول رابطه فیدبکی مثبتی ندارد (۱۲).

در کلینیک‌های ناباروری به منظورکسب تعداد زیادی تخمک از روش تحریک تخمک‌گذاری استفاده می‌شود. این امرخود می‌تواند بر فعالیت آنزیمی تخمدان تاثیر بگذارد (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶). به عنوان مثال تحقیقات نشان داده است تحریک تخمک‌گذاری سبب افزایش فعالیت ALP در مایع فولیکولی تخمدان موش و گاو شده است (۳، ۶). در واقع با افزایش ناگهانی مقدار استروژن و پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری و وابستگی فعالیت آنزیم‌ها به مقدار هورمون‌های تخمدانی، تغییرات زیادی در روند فعالیت ALP تخمدان ممکن است به وجود آید. بنابراین با توجه به اطلاعات مختصر در خصوص تغییرات کمی و کیفی فعالیت ALP بافت تخمدان طی حاملگی اولیه و همچنین تاثیر تحریک تخمک‌گذاری بر فعالیت این آنزیم سعی شد در تحقیق حاضر با استفاده از روش بیوشیمیایی و هیستوشیمیایی تغییرات فعالیت آنزیم ALP طی دوران ابتدای حاملگی موش‌های حامله نرمال و حامله کاذب که در دو گروه تحریک شده و تحریک نشده قرار داشتند مطالعه و از نظر میزان و محل فعالیت آنزیم بررسی شود و همچنین به سوالات زیر پاسخ مناسبی داده شود:

۱. روند فعالیت ALP طی ابتدای حاملگی (به عنوان یک مدل) تا زمان لانه‌گزینی چگونه است؟

۲. آیا تحریک تخمک‌گذاری تخمدان با به کارگیری PMSG و hCG باعث تغییر فعالیت آنزیم ALP طی ابتدای حاملگی در مقایسه با گروه شاهد می‌شود؟

۳. آیا تفاوتی بین فعالیت آنزیم ALP در گروه‌های حامله نرمال با گروه‌های حامله کاذب دیده می‌شود یا نه؟

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موشهای سوری ماده بالغ نژاد NMRI با سن ۶ تا ۱۰ هفته استفاده شد، موش‌ها به دو گروه اصلی تحریک شده و گروه شاهد (تحریک نشده) تقسیم شدند. سپس هر گروه به دو زیر گروه حاملگی به روش طبیعی و حاملگی کاذب تقسیم شدند. بنابراین گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه شاهد حامله به روش طبیعی، گروه شاهد حامله کاذب، گروه تحریک شده و حامله به روش طبیعی، گروه تحریک شده و حامله کاذب بود.

در پروتکل تحریک تخمک‌گذاری به منظور افزایش تعداد و رشد فو لیکول‌ها ۱۰ واحد PMSG (شرکت داروسازی نصر، ایران) به طریق داخل صفاقی و ۴۸ ساعت بعد به هما ن روش ۱۰ واحد hCG (شرکت ارگانون ، هلند) جهت تخمک‌گذاری تزریق شد. موش‌های ماده در دو گروه تحریک شده (پس از تزریق hCG) و گروه شاهد (در ساعت پنج بعدازظهر) به‌صورت تک به تک با موش نر هم‌نژاد خود در یک قفس قرار گرفته و صبح روز بعد برای مشاهده پلاک واژن بررسی شدند. القای بارداری کاذب در گروه‌های حامله کاذب توسط یک سواپ که چندین بار در دهانه واژن چرخانده شد انجام شد (۱۷، ۱۸).

به منظور بررسی‌های کمی و کیفی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به ترتیب از روش‌های بیوشیمیایی و هیستوشیمیایی استفاده شد.

روش بیوشیمیایی

در روش بیوشیمایی از ۱۲۰ سر موش ماده نژاد NMRI و در هر گروه روزانه ۵ سر موش و فعالیت آنزیم از روز اول تا ششم مورد بررسی واقع شد. جانوران به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و هر دو تخمدان به عنوان نمونه در نظر گرفته شد.

پس از آماده شدن نمونه‌ها و نگهداری آنها در ظرف یخ، به وسیله تیغ بیستوری تا حد امکان به قطعات ریزی تقسیم و به لوله آزمایشی که تقریبا دو برابر حجم نمونه بافر (Tris-HCl-buffered salin 0.01) مولار داشت، جهت هموژن کردن منتقل شد. هموژن کردن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه هموژنایزر مکانیکی (مدل HEIDOLPHDIAX600) به مدت یک دقیقه با دور ۲۰۵۰۰ در دقیقه انجام شد. نمونه‌ها سپس در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار با (مدل PK13IR) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴درجه سانتی‌گراد و با دور g۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. آنگاه سوپ رویی از محلول استخراج و از نظر فعالیت آنزیم بررسی شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت بیوشیمیایی (شماره کاتالوگ ۵۰۳-۱۰ :Catno ساخت شرکت زیست شیمی) که در آن از سوبسترای پارانیترو فنیل فسفات استفاده و با روش کالریمتری محاسبه شد. پروتیین کل با استفاده از کیت بیوشیمیایی پروتیین کل (محصول شرکت شیم آنزیم) بر اساس روش برادفورد بررسی و نهایتا فعالیت اختصاصی آنزیم بر اساس میزان فعالیت آنزیم بر میلی‌گرم پروتیین محاسبه شد.

روش آماری

داده‌های این پژوهش با استفاده از برنامه آماری SPSS تحلیل و میانگین واریانس و انحراف معیار در مورد فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه‌های مورد نظر محاسبه شد. برای تعیین معنی‌دار بودن اختلافات از آزمون Mann Whitheny استفاده شد.

روش هیستوشیمیایی

در مطالعات هیستوشیمیایی نیز مشابه روش بیوشیمیایی روزانه ۵ سر موش از هر گروه در نظر گرفته و یکی از تخمدان‌ها انتخاب شد. ابتدا با فویل آلومینیومی قالب‌های استوانه‌ای (به قطر ۱ سانتی‌متر و ارتفاع ۲ سانتی‌متر) تهیه و قالب‌ها با چسب OCT پر شد. بلافاصله بعد از برداشت نمونه در قالب به صورت عمودی قرار گرفته و برای انجماد OCT روی بخار ازت به مدت یک دقیقه نگه داشته سپس به دستگاه کرایوستات منتقل شد. با استفاده از دستگاه کرایوستات (مدل ۱۸۵۰ CM) و با شرایط برودت محفظه ۲۷-درجه سانتی‌گراد برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد.

نمونه‌ها با استفاده از کیت ALP (شماره کاتالوگ ۸۶ شرکت Sigma) که براساس روش AZO-coupling بود، رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا برش‌ها در محلول فیکساتیو شامل سیترات، استن و فرمالدیید به مدت یک دقیقه تثبیت شدند و قبل از خشک شدن، نمونه‌ها در محلول سوبسترای آلفا نفتول فسفات و نمک دیازونیوم به مدت ۳۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus) مشاهده و عکس‌برداری شدند. مناطقی که فعالیت آنزیم وجود داشت به رنگ قرمز مشاهده شده است.

به منظور تعیین حداقل فعالیت آنزیم (واکنش صفر) برشی از بافت تخمدان مطابق مراحل فوق رنگ‌آمیزی شد. با این تفاوت که نمونه‌ها به مدت یک ساعت قبل از رنگ‌آمیزی در شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا فعالیت آنزیم به وسیله گرما مهار شود. همچنین جهت کنترل مثبت از برش‌های روده کوچک استفاده شد و در ارزیابی میکروسکوپی نمونه‌ها، حداکثر واکنش آنزیم با ۴+ و حداقل واکنش با صفر مشخص و واکنش‌های حد واسط به‌طور نسبی بین اعداد فوق در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مطالعات بیوشیمیایی

خلاصه‌ای از فعالیت اختصاصی آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های تخمدانی گروه‌های تحریک شده و شاهد در جدول یک درج شده است.

یافته‌های به دست آمده نشان می‌دهد فعالیت اختصاصی ALP در گروه شاهد حامله طبیعی و گروه تحریک شده حامله طبیعی به صورت خطی از روز اول تا ششم افزایش یافته است. مقایسه فعالیت اختصاصی ALP در دو گروه مذکور نشان می‌دهد فعالیت آنزیم ALP در گروه تحریک شده از روز دوم تا پنجم نسبت به گروه شاهد افزایش و در روز اول و ششم کاهش داشته است و این تغییرات در تمام روزها به استثنای روزهای اول و چهارم از لحاظ آماری معنی‌دار ($p<0/05$) است.

در گروه شاهد حامله کاذب فعالیت آنزیم از روز اول تا چهارم افزایش یافت و حداکثر فعالیت آنزیم در روز چهارم مشاهده شد. سپس فعالیت آنزیم تا روز ششم کاهش پیدا کرد. مقایسه آماری فعالیت اختصاصی آنزیم آلکالین فسفاتاز در دو گروه شاهد حامله طبیعی و گروه شاهد حامله کاذب حاکی از آن بود که فعالیت آن در گروه شاهد حامله طبیعی به مراتب بیشتر از گروه شاهد حامله کاذب است و اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) در تمام روزها وجود داشت.

در گروه تحریک شده و حامله کاذب الگوی فعالیت ویژه آنزیم تا روز دوم افزایش یافت. حداکثر فعالیت آنزیم در روز دوم مشاهده شد و سپس فعالیت آن تا روز ششم کاهش پیدا کرد (جدول ۱).

یافته‌های آماری حاصل از مقایسه روزانه فعالیت مخصوص آنزیم در گروه شاهد و تحریک شده حامله کاذب حاکی از آن بود که تغییرات فعالیت اختصاصی آنزیم در تمامی روزها به غیر از روز ششم تفاوت معنی‌دار داشت ($p<0/05$).

جدول ۱: میانگین و مقایسه روزانه فعالیت اختصاصی ALP (واحد بر میلی‌گرم) در نمونه‌های استخراج بافتی تخمدان در گروه‌های تحریک شده و تحریک نشده

روز حاملگی / گروه‌های مورد مطالعه	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم
گروه شاهد حامله طبیعی	۰/۸۸۳±۰/۱۱۷	۱/۲۵۱±۰/۱۰۶	۱/۶۷۴±۰/۱۶۹	۲/۴۹۴±۰/۱۹۰	۲/۷۴۵±۰/۱۷۵	۲/۶۹۳±۰/۳۲۳
گروه شاهد حامله کاذب	۰/۳۳۸±۰/۰۷۸ α	۰/۶۰۶±۰/۰۶۵ α	۱/۳۷۷±۰/۱۶۴ α	۱/۷۸۵±۰/۰۵۰ α	۰/۷۸±۰/۰۱۵ α	۰/۲۷۴±۰/۱۰۷ α
گروه تحریک شده حامله طبیعی	۰/۸۶۳±۰/۰۷۹	۱/۶۸۳±۰/۲۰۹ α	۲/۱۹۶±۰/۱۴۸ α	۲/۵۴۸±۰/۲۶۲	۲/۲۶۸±۰/۲۲۷ α	۳/۳۱۵±۰/۰۳۵ α
گروه تحریک شده حامله کاذب	۰/۷۰۵±۰/۱۱۹ *bc*	۱/۲۳۰±۰/۰۹۷ *bc*	۰/۹۹۸±۰/۰۷۵ *bc*	۰/۸۱۲±۰/۰۳۶ *bc*	۰/۴۸۸±۰/۰۸۶ *bc*	۰/۲۴۶±۰/۰۳۶ *c*

***α*: وجود اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد حامله طبیعی، *b*: وجود اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد حامله کاذب، *c*: وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تحریک شده و حامله طبیعی**

اعداد به صورت mean±SD است.

جدول ۲: ارزیابی هیستوشیمیایی شدت واکنش آنزیم ALP تخمدان، از روز اول تا ششم در گروه‌های مورد نظر

گروه‌های مورد مطالعه	روز حاملگی	فعالیت آنزیم سلول های تکا	
		حداقل واکنش (درصد)*	حداکثر واکنش (درصد)*
گروه شاهد حامله طبیعی	روز اول	۰(۸۰)	+۱(۲۰)
گروه شاهد حامله کاذب		۰(۲۰)	+۱(۸۰)
گروه تحریک شده حامله طبیعی		۰(۸۰)	+۱(۲۰)
گروه تحریک حامله کاذب		+۲(۸۰)	+۳(۲۰)
گروه شاهد حامله طبیعی	روز دوم	۰(۲۰)	+۱(۸۰)
گروه شاهد حامله کاذب		+۱(۲۰)	+۲(۸۰)
گروه تحریک شده حامله طبیعی		۰(۴۰)	+۱(۶۰)
گروه تحریک حامله کاذب		+۲(۲۰)	+۳(۸۰)
گروه شاهد حامله طبیعی	روز سوم	+۱(۲۰)	+۲(۸۰)
گروه شاهد حامله کاذب		+۲(۶۰)	+۳(۴۰)
گروه تحریک شده حامله طبیعی		+۱(۶۰)	+۲(۴۰)
گروه تحریک حامله کاذب		+۳(۸۰)	+۴(۲۰)
گروه شاهد حامله طبیعی	روز چهارم	+۲(۴۰)	+۳(۲۰)
گروه شاهد حامله کاذب		+۲(۲۰)	+۳(۸۰)
گروه تحریک شده حامله طبیعی		+۲(۸۰)	+۳(۲۰)
گروه تحریک حامله کاذب		+۱(۲۰)	+۲(۸۰)
گروه شاهد حامله طبیعی	روز پنجم	+۳(۲۰)	+۴(۸۰)
گروه شاهد حامله کاذب		+۱(۲۰)	+۲(۸۰)
گروه تحریک شده حامله طبیعی		+۳(۶۰)	+۴(۴۰)
گروه تحریک حامله کاذب		۰(۲۰)	+۱(۸۰)
گروه شاهد حامله طبیعی	روز ششم	۰	+۴(۱۰۰)
گروه شاهد حامله کاذب		۰(۸۰)	+۱(۲۰)
گروه تحریک شده حامله طبیعی		+۳(۲۰)	+۴(۸۰)
گروه تحریک حامله کاذب		۰(۸۰)	+۱(۲۰)

*فعالیت آنزیم در پنج گروه از صفر تا چهار مثبت با توجه به شدت فعالیت آنزیم تعیین شد و میزان حداقل واکنش آنزیم صفر و حداکثر آن ۴ مثبت در نظرگرفته شده است. اعداد داخل پرانتز نمایانگر میزان درصد فعالیت آنزیم در سلول‌های تکا در روزهای تعیین شده از حاملگی است.

همچنین آنالیز آماری نتایج به دست آمده از مقایسه فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه تحریک شده و حامله طبیعی و تحریک شده حامله کاذب نشان داد که فعالیت آنزیم در گروه حامله طبیعی به مراتب بیشتر از گروه حامله کاذب بود و اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) در تمام روزها وجود داشت.

خلاصه‌ای از مقایسه روزانه فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های تخمدانی در گروه‌های تحریک شده و شاهد در جدول ۱ آمده است.

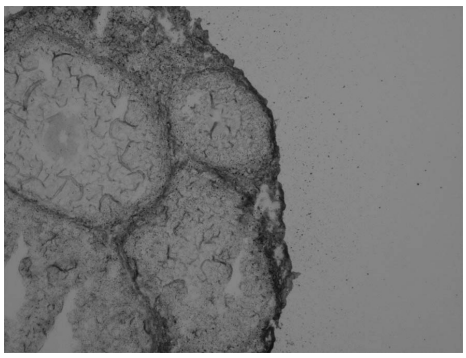
نتایج مطالعات هیستوشیمیایی

نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپ نوری حاکی است فعالیت آنزیم ALP تخمدانی فقط در سلول‌های تکا قابل مشاهده است. همچنین محل‌های واکنش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به شکل مناطق قرمز رنگ مشاهده شد.

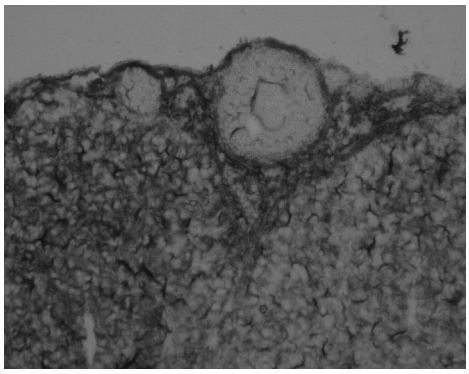
دامنه تغییرات شدت واکنش آنزیم در گروه شاهد حامله به روش طبیعی بین ۰ و ۴+ متغیر بود. حداقل واکنش آنزیم در این گروه در روز اول (۰ و ۱+) و حداکثر شدت واکنش آنزیم در روز پنجم و ششم (۴+) مشاهده شد. الگوی تغییرات شدت واکنش آنزیم در سایر روزها بین ۱+ و ۴+ بود که خلاصه‌ای از این نتایج در جدول ۲ آمده است. محدوده تغییرات واکنش آنزیم در گروه شاهد حامله کاذب بدین‌ترتیب بود که حداقل‌وحداکثر واکنش آنزیم در روز اول و ششم بین ۰ و ۱+ مشاهده شد و در روز دوم و پنجم بین ۱+ و ۲+ متغیر بود. شدت واکنش آنزیم در روز سوم و چهارم بین ۲+ و ۳+ متغیر بود، در روز سوم ۴۰ درصد نمونه‌ها و در روز چهارم ۸۰ درصد نمونه‌ها واکنش ۳+ نشان دادند (جدول ۲، شکل ۱، شکل ۲).

در گروه تحریک شده حامله به روش طبیعی دامنه تغییرات شدت واکنش آنزیم در روز اول و دوم بین ۰ و ۱+ مشاهده شد به همین ترتیب در روز سوم بین ۱+ و ۲+ و در روز چهارم بین ۲+ و ۳+ متغیر بود. اما

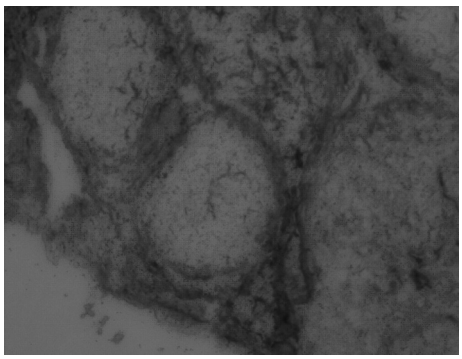
حداکثر شدت واکنش آنزیم (۴+) در روزهای پنجم و ششم مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۳).



شکل ۱: تصویر تخمدان موش گروه شاهد حامله کاذب در روز دوم. پس از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی آلکالین فسفاتاز. فعالیت آنزیم به شکل نقاط قرمز در سلول‌های تکا قابل مشاهده است (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×)
(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)



شکل ۲: تصویر تخمدان موش گروه شاهد حامله کاذب در روز چهارم. پس از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی آلکالین فسفاتاز. فعالیت آنزیم به شکل نقاط قرمز در سلول‌های تکا قابل مشاهده است (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×).
(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)



شکل ۳: تحریک تخمدان موش گروه تحریک شده و حامله طبیعی در روز دوم. پس از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی آلکالین فسفاتاز. فعالیت آنزیم به شکل نقاط قرمز در سلول‌های تکا قابل مشاهده است (بزرگنمایی ۱۰۰×).
(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

در گروه تحریک شده حامله کاذب فعالیت آنزیم در سه روز اول نسبتا بالاتر از بقیه روزها بود به گونه‌ای که در این سه روز فعالیت آنزیم بین ۲ تا ۴ متغیر اما در روزهای چهارم تا ششم فعالیت آنزیم کمتر شده و بین ۰ و ۲ متغیر بود (جدول ۲).

بحث

در گروه شاهد حامله به روش طبیعی نتایج ارزیابی‌های بیوشیمیایی با هیستوشیمیایی مطابقت داشت و روند تغییرات فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تخمدان به گونه‌ای بود که فعالیت آنزیم به صورت خطی از روز اول تا ششم افزایش یافت.

یافته‌های هیستوشیمیایی نشان داد که جایگاه فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز اساسا در سلول‌های تکا بود و این سلول‌ها نیز در فرآیند استروییدسازی نیاز به مواد و سوبستراهای اولیه دارند. احتمالا آلکالین فسفاتاز با نقش انتقالی و دفسفوریله کردن ترکیبات، می‌تواند در فرآیند استروییدسازی به سلول‌های تکا کمک کند (۷، ۸). با توجه به اینکه افزایش فعالیت آنزیم در سلول‌های تکا با زمان لانه‌گزینی جنین در آندومتر مقارن است، بنابراین این امر می‌تواند به علت افزایش فعالیت استروییدسازی در تخمدان باشد و این هورمون‌های مترشحه می‌توانند سبب افزایش فعالیت ALP تخمدانی شوند.

گزارش‌هایی مبنی بر حضور آنزیم آلکالین فسفاتاز در مایع فولیکولار گاو، خوک و انسان وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت ALP با فولیکول آترزی مقارن است (۱۹). گزارش دیگری نشان داد داده است فعالیت ALP در فولیکول‌های گاو قبل از تخمک‌گذاری بیشتر از سایر مراحل سیکل استروس است زیرا غلظت استرادیول و گنادوتروپین‌ها بالا است (۱۱).

روند تغییرات فعالیت آنزیم در گروه شاهد حامله کاذب تا روز چهارم افزایش و پس از آن کاهش پیدا کرد. علت افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تخمدانی در سلول‌های تکا تا روز چهارم پس از تخمک‌گذاری احتمالا در پاسخ به واکنش جسم زرد قاعدگی است.

مقایسه دو گروه شاهد حامله به روش طبیعی و شاهد حامله کاذب حاکی از افزایش فعالیت آنزیم در گروه حامله به روش طبیعی است، به طوری که در تمام روزها اختلاف معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد وجود سیگنال‌های جنینی در بروز افزایش فعالیت آنزیم می‌تواند موثر باشد. به خصوص در تعامل دو طرفه بین سلول‌های تروفواکتودرم (جفت اولیه) و تخمدان که در بقای جسم زرد و تداوم فعالیت آن دخالت دارد، می‌تواند یکی از علل توجیه افزایش فعالیت ALP گروه حامله نرمال در مقایسه با حامله کاذب باشد.

روند فعالیت آنزیم در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده و حامله به روش طبیعی به صورت خطی افزایش یافت. مقایسه فعالیت آنزیم بین گروه‌های تحریک شده و شاهد حامله طبیعی نشان داد فعالیت آنزیم در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده نسبت به گروه شاهد افزایش داشت. پروتکل تحریک تخمک سبب آزاد شدن تعداد زیادی تخمک می‌شود، در نتیجه تعداد زیادی جسم زرد ایجاد می‌شود (۲۰) و فعالیت ALP تخمدان در این گروه نسبت به گروه شاهد حامله طبیعی افزایش می‌یابد.

فعالیت آنزیم در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده و حامله

کاذب تا روز دوم افزایش و سپس کاهش پیدا کرد. مقایسه بین دو گروه تحریک تخمک‌گذاری شده حامله کاذب و شاهد حامله کاذب نشان داد تفاوت معنی‌داری در اکثر روزها وجود دارد و به نظر می‌رسد با توجه به نبود جنین و سیگنال‌های مربوط به آن و احتمالا مداخلاتی که می‌تواند این سیگنال‌ها بر روند فعالیت آنزیم داشته باشد تحریک تخمک‌گذاری در نمونه حامله کاذب نتیجه متفاوتی در مقایسه با گروه‌های حامله طبیعی از خود نشان داده است که نیاز به بررسی بیشتری دارد.

مقایسه بین دو گروه تحریک تخمک‌گذاری حامله به روش طبیعی و کاذب حاکی از آن بود که فعالیت آنزیم در گروه تحریک شده و حامله کاذب نسبت به گروه تحریک شده و حامله به روش طبیعی کاهش داشت و اختلاف معنی‌داری در تمامی روزها نشان داد. احتمالا عامل جفت با ترشح hCG سبب افزایش فعالیت ALP تخمدانی در گروه تحریک شده حامله به روش طبیعی شده است در حالی که در گروه تحریک تخمک‌گذاری حامله کاذب hCG تولید نشده که بتواند باعث افزایش فعالیت ALP بشود. مطالعات نشان داد فعالیت ALP در مایع فولیکولار تخمدان موش بعد از به‌کارگیری گنادوتروپین‌های اگزوژنوس افزایش می‌یابد (۸، ۱۶) که نتایج به دست آمده تحقیق حاضر با گزارش فوق مطابقت دارد.

ون‌کمپن و همکاران اعلام کرده‌اند که تحریک تخمک‌گذاری سبب افزایش فعالیت ALP در مایع فولیکولار گاو می‌شود. به نظر می‌رسد که غلظت بالای گنادوتروپین‌ها سبب افزایش فعالیت ALP فولیکولی شود (۱۱).

دالن‌بچ نیز گزارش کرده است نقص در تمایز غدد و سلول‌های استرومایی آندومتر که به دنبال تحریک تخمک‌گذاری ایجاد می‌شود، می‌تواند به علت نقص در جسم زرد تخمدان باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تحریک تخمک‌گذاری با تغییرات آنزیمی تخمدان (ALP) می‌تواند بر تکوین و عملکرد جسم زرد تاثیرگذار باشد و روند حاملگی را تحت تأثیر قرار دهد (۲۱).

نتیجه‌گیری

بنابراین در مجموع، ارزیابی‌های بیوشیمیایی نشان داد فعالیت ALP در گروه‌های تحریک تخمک‌گذاری شده تخمدان تغییر می‌کند و مکان اصلی تغییرات فعالیت آنزیم در سلول‌های تکا تخمدانی است و از آنجایی که در گزارش‌های قبلی به نتایج نامطلوب رژیم‌های درمانی تحریک تخمک‌گذاری مانند کاهش پذیرندگی رحم، درصد کم لانه‌گزینی، کیفیت پایین جنین اشاره شده است می‌توان تغییرات آنزیم ALP که پس از تزریق هورمون‌های PMSG و hCG اتفاق می‌افتد را به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده اختلال در پذیرندگی رحم در نظر گرفت که خود می‌تواند به علت تغییرات فعالیت آنزیم تخمدانی و تغییرات بیوشیمیایی تخمدان و عملکرد جسم زرد پس از تحریک تخمک‌گذاری باشد.

Refrences

1. Bucci M, Murphy CR: Differential alteration in the distribution of three phosphatase enzymes during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells in the rat. Cell Biol Int 1999; 23: 21-30
2. Harris H: The human alkaline phosphatase. Clin Chim Acta 1998; 186: 133-145
3. Bucci M, Murphy CR: Hormonal control of enzyme activity during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells. Cell Biol Int 2001; 25(9): 859-871
4. Bugalia NS, Sharma RD: Endometrial glycogen, protein, nucleic acids and phosphatases during oestrous cycle in buffaloes. Br Vet J 1990; 146: 362-559
5. Zamiri MJ: Acid and alkaline phosphatase in histologically defined areas of the sheep uterus and placenta: histochemical and microfluorometric analysis. Aust J Biol Sci 1988; 33: 549-55
6. Hall K: 5-Nucleotidase, acid phosphatase and phosphorylase during normal, delayed and induced implantation of blastocysts in mice: a histochemical study. J Endocrinol 1991; 51: 291-301
7. Jon CH, William ER, Bruce RC: Ovarian granulosa cell lines. Mol Cell Endocrinol 2004; 228: 67-78
8. Gougeon A, Dolores Busso: Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. Mol Cell Endocrinol 2000; 163: 33-41
9. Murphy CR, Shaw TG: Plasma membrane transformation a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period. Cell Biol Int 1994; 18: 1115-1128
10. Hansel W, Convey EM: Physiology of the estrous cycle. J Anim Sci 1983; 57(2): 404-410
11. Van kampen K: Localization of alkaline phosphatase in the ovary of Notopterus. Exp Cell Res 1984; 24: 565-569
12. Goode V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG: Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. Lab Invest 1998; 78: 1385-94
13. Hosie MJ, Murphy CR: Clomphene citrate alters surface ultrastructure of uterine luminal epithelial cell. Anat Rec 1992; 145: 175-178

14. Gunian A: Effect of ovarian hormone on cell membrane in the rat uterus. Eur J Obset Gynecol Reprod Biol 1995; 60(1): 69-74
15. Trounson A, Darid KG: Hand book in vitro fertilization. London Tokyo: CRC press, 1993, pp. 4-11
16. Asgerally TF, Zuzana S: Endometrial function: cell specific changes in the uterine enviroment. Mol Cell Endocrinol 2002; 186: 149-147
17. Emadi SM, Salehnia M: Localization and activity of mouse endometrial alkaline phosphatase after hyperstimulation and progesterone injection at the implantation time. Iranian Biomedical J 2004; 8(3): 121-126
18. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E: Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual cold spring Harborlabratoy press (CSHL PRESS). 1994, pp. 21-133
19. Tsiliqianni Th, Karagiannids A, Saratsis Ph, Brikas P: Enzyme activity in bovine cervical mucus during spontaneous and induced estrus. Canadian J Vet Res 2003; 67: 189-193
20. Hillier SG: Current concepts of roles of follicle stimulating hormone and luteinzing hormone in folliculogenesis. Hum Reprod 1994; 9(2): 188-191
21. Dallenbach HG: The endometrium in natural and artificial luteal phases. Hum Reprod 1988; 3(2): 165-8