مطالعه تأثیر مایع فولیکولی انسان بر لانه‌گزینی و جلوگیری از بارداری در موش بزرگ آزمایشگاهی

مریم کبیر سلمانی M.Sc.☆♦، احمد حسینی Ph.D.*، مجتبی رضازاده Ph.D.☆، تقی الطریحی Ph.D.☆
منوچهر فضلی M.Sc.*

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

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

* موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر مایع فولیکولی انسان بر درصد بارداری و تعداد موالید در دو گونه موش صحرایی مختلف جهت معرفی یک روش جلوگیری از بارداری

* **مواد و روشها:** در این مطالعه ۹۹ سر موش آزمایشگاهی ماده از نژاد Albino NMRI و ۱۰۲ سر موش بزرگ آزمایشگاهی ماده از نژاد Sprague Dawley که سن آنها بین ۳ تا ۷ ماه بود پس از هم قفس شدن یا موشهای نر بالغ و مشاهده پلاک واژن، در قفسهای جداگانه نگهداری شدند. حیوانات در هر یک از نژادها به طور تصادفی در سه گروه آزمایش، دارونما و کنترل قرار داده شدند. به گروه آزمایش در روز پنجم بارداری، مایع فولیکولی فیلتر شده تازه و در گروه دارونما در همین روز، محیط Ham's F-10 به داخل رحم از طریق واژینال تزریق شد. حیوانات قبل از تزریق تحت بیهوشی استنشاقی با اتر قرار گرفته و پس از تزریق نیز به مدت ۵ دقیقه به صورت وارونه در وسیله مهار کننده نگه داشته شدند.

پس از طی دوران بارداری در روز اول زایمان، تعداد موالید شمارش و درصد حاملگی نیز اندازه گیری شد؛ نتایج بدست آمده پس از پردازشهای آماری با یکدیگر مقایسه شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از پردازشهای آماری نشانگر وجود اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) بین گروههای آزمایش و دارونما (Ham's F-10) و گروههای آزمایش و کنترل بود. کاهش درصد بارداری و تعداد موالید در گروهی که به آن مایع فولیکولی فیلتر شدهٔ تازه تزریق شده بود؛ می‌تواند معرف روش جدیدی در جلوگیری از بارداری تلقی شود.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به تجزیه و تحلیلهای آماری، مایع فولیکولی می‌تواند با شستشوی سطح مجرایی اندومتر در نزدیکی زمان باز شدن پنجره لانه گزینی با ایجاد تغییراتی در پذیرش اندومتر یا اختلال در تکامل بلاستوسیست، مانع از لانه گزینی موفق جنین به داخل اندومتر شود. مکانیسم دقیق نحوه تأثیر مایع فولیکولی و همچنین جزء فعال و مؤثر مایع فولیکولی در این روند کاملاً شناخته شده نیست و مطالعات وسیعتری را می‌طلبد.

کل واژگان: مایع فولیکولی، لانه گزینی، جلوگیری از بارداری

مقدمه

علیرغم آنکه در انسان فقط ۲۵ درصد از تخمکهای لقاح یافته تبدیل به یک موجود زنده می‌شود (۱)؛ مسأله کنترل بارداری و روشهای جلوگیری از آن همواره در جوامع مختلف بشری مطرح بوده و سابقه آن به بیش از چهار هزار سال پیش، باز می‌گردد (۲). با وجود اهمیت و قدمت مطالعات انجام شده در این زمینه، هنوز شاهد بارداریهای ناخواسته حتی در جوامع توسعه یافته (۳) و افزایش اخطار دهنده و غیر قابل کنترل جمعیت در جهان هستیم (۴).

امروزه به ویژه در جوامع در حال توسعه نیاز مبرمی به معرفی روشهای جدید جلوگیری از بارداری احساس می‌شود که نسبت به روشهای موجود مؤثرتر و مطمئن‌تر و از لحاظ استفاده عملی آسانتر باشد (۳). علت عدم مقبولیت روشهای متداول مانند داروهای ضد بارداری خوراکی می‌تواند به عوامل زیر بستگی داشته باشد:

۱ـ عدم پذیرش مصرف دراز مدت داروهای هورمونی در فرهنگهای مختلف، ۲ـ فراموشی در مصرف به موقع و روزانه داروهای خوراکی و ۳ـ عدم اطمینان به جلوگیری از بارداری فقط در زمان مورد نظر و در واقع برگشت‌پذیر بودن بارداری (۵).

با التفات به عوارض سوء جانبی و عدم اطمینان کافی به روشهای متداول جلوگیری از بارداری (۶،۷)، توجه خاصی به روشهای جلوگیری از لانه‌گزینی پس از لقاح[1] و واکسنهای ضد بارداری معطوف گردیده است (۸، ۹، ۱۰). اهدافی که در روشهای جلوگیری از لانه گزینی مطرح هستند شامل مراحل رشد جنین پیش از لانه‌گزینی، انتقال جنین در لوله رحم، تکامل اندومتر قبل از لانه‌گزینی، پیامهای جنین به مادر، تقابل جنین و اندومتر، چسبندگی جنین به اندومتر و تهاجم است (۸).

در تحقیق حاضر با توجه به مطالعات انجام شده (۱۱)، تأثیر مایع فولیکولی به عنوان یک منبع غنی از آنزیمهای پرتئولیتیک (۱۲) بر لانه گزینی در دو نژاد از موش بزرگ آزمایشگاهی بررسی شده است. در این بررسی از محیط Ham's F-10 که از نظر ترکیبات یونی و شرایط pH و خواص فیزیکی با مایع فولیکولی مشابه ولی فاقد هرگونه آنزیم است برای تزریق به گروه دارونما استفاده شده است تا تأثیر روش کار و تزریق نیز بررسی گردد.

مواد و روشها

۱۰۲ سر موش بزرگ آزمایشگاهی ماده از نژاد Sprague Dawley و ۹۹ سر موش بزرگ آزمایشگاهی ماده از نژاد Albino NMRI که سن آنها بین ۳ تا ۷ ماه بود از موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی تهیه شد. حیوانات به علت حساسیت به سیکل نوری در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و پس از هم قفس شدن با موشهای نر بالغ صبح روز بعد جهت مشاهده پلاک واژن بررسی شدند. وجود پلاک واژن به عنوان علامت اولین روز بارداری تلقی می‌شود.

ماده‌های پلاک واژن مثبت در هر نژاد به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شد؛ بدین ترتیب که در گروه اول یا آزمایش در روز پنجم بارداری از طریق واژینال مایع فولیکولی فیلترشده و تازه به داخل شاخهای رحم تزریق شد. در گروه دوم یا دارونما در روز پنجم بارداری محیط Ham's F-10 از طریق واژینال به داخل رحم تزریق شد و گروه سوم یا کنترل بدون هیچگونه تزریقی روند طبیعی خود را طی نمودند. مایع فولیکولی از پژوهشکده رویان وابسته به جهاد علوم پزشکی ایران تهیه شد؛ بدین ترتیب که پس از طی مراحل درمانی متداول برای IVF و ICSI، از طریق سونوگرافی واژینال، فولیکولها تخلیه شده و مایع بدست آمده سانتریفوژ گردید. سپس از فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شد تا فاقد هرگونه سلول گردد و لوله‌های سربسته در داخل یخچال (دمای ۴° سانتی‌گراد) نگهداری شد. نحوه تزریق بدین صورت بود که یک سرلوله‌های استریلی به نام Cut down tube به اندازه ۱۴ FR را به سرنگ حاوی مایع فولیکولی وصل شد و انتهای دیگر از طریق واژن به سمت شاخهای رحم هدایت شد و سپس به آرامی حدود ۰/۷ سی‌سی از مایع تزریق شد و حیوان به مدت ۵ دقیقه به حالت وارونه نگه داشته شد. لازم به ذکر است که حیوانات برای کنترل بیشتر، قبل از شروع تزریق تحت بیهوشی استنشاقی توسط دی اتیل اتر قرار گرفتند و پس از تزریق نیز در داخل وسیله مهارکننده[2] قرار داده شدند؛ سپس در قفسهای جداگانه نگهداری شدند تا دوران بارداری آنها طی شود. در موشهای باردار در روز اول زایمان تعداد موشهای متولد شده شمارش شد.

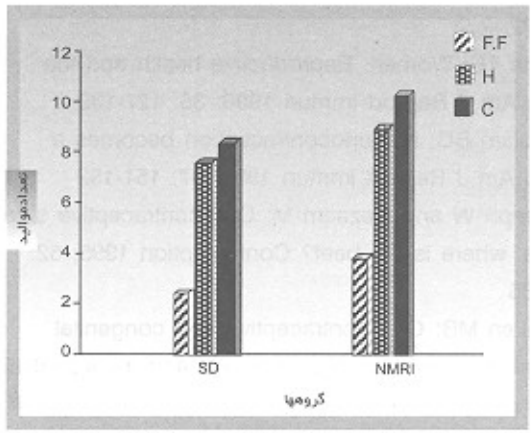
محیط Ham's F-10 نیز با روش کاملاً مشابه با روش فوق در روز پنجم بارداری به نمونه‌های گروه دارونما تزریق شد. پس از طی دوران بارداری که در موش بزرگ آزمایشگاهی بین ۲۱ تا ۲۳ روز است؛ تعداد موشهای باردار و در روز اول زایمان در آنها تعداد موالید شمارش و میانگین محاسبه شد. سپس توسط برنامه نرم‌افزاری SPSS، آزمون آماری Student t-test برای ارزیابی داده‌ها و مقایسه گروهها استفاده شد.

یافته‌ها

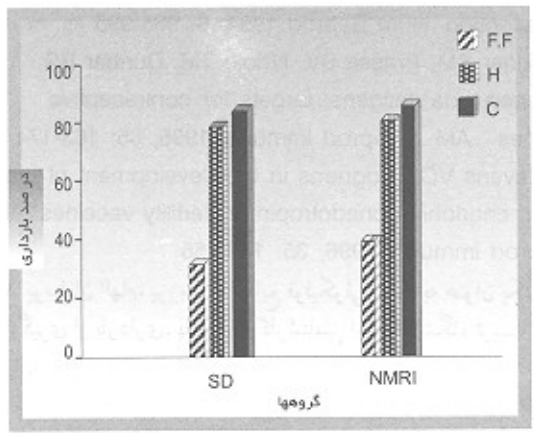
آنالیز واریانس میانگین تعداد جنینها نمایانگر وجود اختلاف معنی داری ($P<0.05$) بین گروههای آزمایش و دارونما (مایع فولیکولی Ham's F-10) و همچنین گروههای آزمایش وکنترل بود. در حالی که تفاوت معنی داری بین گروههای شاهد و کنترل در هیچ یک از نژادها مشاهده نشد.

یافته‌های آماری دربارهٔ درصد بارداری در دو نژاد استفاده شده، تفاوت معنی داری ($P<0.05$) بین گروههای آزمایش و دارونما و همچنین آزمایش وکنترل نشان می‌دهد. بین گروههای شاهد و کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از پردازش داده‌های آماری در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

1. Interception
2. Restrainer



نمودار ۱: تعداد جنینها در هر موش



نمودار ۲: درصد بارداری

بحث

مایع فولیکولی یک منبع غنی از آنزیمهای پروتئولیتیک از جمله پلاسمین، متالوپروتئینازها (۱۳) و همچنین آنزیمهایی نظیر هیالورونیداز (۱۴)، اندوپپتیداز (۱۵) و کلاژناز (۱۶) است که در زمان تخمک‌گذاری می‌تواند موجب تخریب غشای پایه و دیواره فولیکول شود (۱۳).

با توجه به این امر که لانه‌گزینی موفقیت‌آمیز مرهون همکنشی بین اندومتر پذیرا و بلاستوسیست مهاجم است (۱۷)، مایع فولیکولی تزریق شده به شاخهای رحم بلافاصله قبل از زمان بازشدن پنجره لانه‌گزینی[1] می‌تواند اثرمستقیمی بر پذیرش[2] اندومتر رحم داشته باشد و یا اینکه تأثیرات منفی بر روی بلاستوسیست گذاشته و مانع لانه‌گزینی آن شود.

به هنگام لانه‌گزینی در محدوده زمانی خاص به‌نام پنجره لانه‌گزینی، تغییراتی در غشای پلاسمایی فوقانی سلولهای اپی‌تلیوم مجرایی اندومتر ایجاد می‌شود که موجب بروز حالت پذیرندگی آن می‌گردد. یکی از این تغییرات مهم پدیدار شدن زواید فنجانی شکلی به نام پینوپود[3] است که با تخلیه مایع رحمی به‌روش پینوسیتوز موجب فشرده شدن جنین به اپی‌تلیوم رحم و آغاز واکنشهای شیمیایی بین جنین و اندومتر می‌شود که این تغییرات نشان‌دهندهٔ اولین مرحله لانه‌گزینی است (۱۸).

از تغییرات سطحی دیگر در زمان باز شدن پنجره لانه‌گزینی به کاهش ضخامت گلیکوکالیکس‌ها در سطح سلولهای اپی‌تلیومی (۱۹)، ظهور رسپتور پروتئوگلیکان هپارین سولفات (۲۰)، افزایش میزان لامینین موجود در غشای پایه (۲۱)، کوتاه شدن میکروویلیهای سطحی و ناپدید شدن آنها (۲۲) و... می‌توان اشاره کرد که ایجاد اختلال و تغییر در هر یک از عوامل فوق توسط مایع فولیکولی می‌تواند موجب عدم پذیرش اندومتر شود. برای مثال آنزیمهای مختلف موجود در مایع فولیکولی از جمله پلاسمین، قادر است موجب تجزیه لامینین و فیبرونکتین شود و متعاقب آن اتصال و تهاجم بلاستوسیت امکان‌پذیر نخواهد بود. مکانیسم دقیق نحوه عملکرد مایع فولیکولی در کاهش درصد بارداری و تعداد موالید کاملاً شناخته شده نیست. البته گزارشهایی در خصوص ریزش اندومتر در شرایط In vitro تحت تأثیر مایع فولیکولی (۱۱) و همچنین تأثیر سم، مایع فولیکولی تازه بر روند مراحل اولیه تکامل جنین (۲۳) و نیز گزارشهای ضد و نقیض در این مورد وجود دارد.

در این تحقیق شاهد کاهش درصد بارداری و تعداد موالید تحت تأثیر مایع فولیکولی تازه و فیلتر شده در موش بزرگ آزمایشگاهی بودیم. نحوهٔ عملکرد دقیق مایع فولیکولی در این روند و همچنین شناخت جزء یا اجزای فعال یا مؤثر مایع فولیکولی در این راستا، بررسیهای وسیع‌تری را می‌طلبد و تعمیم این یافته‌ها بر نمونه‌های انسانی، نیاز به مطالعه در خصوص دیگر گونه‌ها و آشنایی با مکانیسم عمل آنها دارد.

لازم به ذکر است که نتایج این تحقیق منطبق بر مطالعات انجام شده روی موش سوری است (۱۱).

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر به هزینه دانشگاه تربیت مدرس انجام شده و محققین بر خود لازم می‌دانند که از راهنماییهای جناب آقای دکتر محمدحسین نصراصفهانی و همکاری سرکار خانم لیلا کریمیان و سرکار خانم آذر عسگریان از پژوهشکده رویان و همچنین همکاری و راهنمایی آقایان پوراحمدی و جعفری از موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی صمیمانه تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Bloklage CE: Survival probability of human conceptions from fertilization to term . Int J Fertil 1990; 35: 189-194

2. Habenicht VF, Stock G: Development of new immunocontraceptives - industerial perspective. Am J Reprod Immunol 1996; 35: 517-522

3. Baird DT, Glasier AF: Science, medicine and future:

1. Pinopode
2. Receptivity
3. Implantation window

contraception, a clinical review. BMJ 1999; 319: 969-972
4. Wirth TE: Women, Reproductive health and the future. Am J Reprod Immun 1996; 35: 127-130.
5. Coulam BC: Immunocontraception becomes a reality. Am J Reprod immun 1997; 37: 151-152
6. Joseph W and Nezaam M: Oral contraceptive side effects: where is the beef? Contraception 1995; 52: 327-335
7. Braken MB: Oral contraceptive and congenital malformation in offsprings: a review and meta-analysis of the prospective studies. Obstet Gynecol 1990; 76: 552-557
8. Edward RG: Review of implantation, interception and contraception. Hum Reprod 1994; 6: 985-995
9. Skinner SM, Prassa SV, Ndolo TM, Dunbar BS: Zona pellucida antigens: targets for contraceptive vaccines . AM J Reprod immunol 1996, 35: 163-174
10. Stevens VC: Programs in the development of human chorionic gonadotropin antifertility vaccines. AM J Reprod immunol 1996, 35: 148-155
۱۱. یوسفیان الهام، بررسی اثر مایع فولیکولی انسان به عنوان یک روش جلوگیری از بارداری. پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه تربیت مدرس تهران، سال ۱۳۷۷
12. Edward RG: Follicular fluid, J Reprod Fertil Stril 1974; 37: 189-219
13 Rondell P: Biophysical aspects of ovulation. Biol Reprod Suppl 1970; 2: 64
14. Zachariae F, Jensen CE: Studies on the mechanism of ovulation. Acta Endocrin 1958; 27: 343
15. Jung G: Biochemische unter suchunge uber enzyme in ovarium in: Enzyme des ovariums. Fortsh Geburtsh Gynak 1965; 23:77
16. Puistola U: Type IV collagenolgytic activity in human preovulatory follicular fluid. Fertil Stril 1986; 45: 578-580
17. Klentzeris LD: The role of endometrium in implantation. Hum Reprod 1997; 2: 170-175
18. Psychoyos AP, Nikas G: Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity. Aassis Rreprod Rev 1994; 4: 26-32
19. Tabibzadeh S, Babakaia A: The signals and mollecular pathways involved in implantation. Hum Reprod 1995; 10: 1579-1602
20. Rogers PAW: Current studies on human implantation: a brief over veiw. Reprod Fertil Develop 1995; 7: 1395-1399
21. Hujanen TT, Ronnberg L, Kaupila A, Puistula A: Laminin in the human embryo implantation: analogy to the invasion by malignant cells. Fertil Strill 1992; 58: 105-113
22. Murphy CR, Shaw TJ: Plasma membrane transformation: A common response of uterine epithelial cell during the peri implantation period. Cell Biol Int 1994; 18: 1115-1128
۲۳. کریمپور عباسعلی: اثر مایع فولیکولار انسان و مایع رحمی موش بر رشد و نمو جنین‌های مرحله قبل از لانه گزینی در محیط آزمایشگاه. پایان نامه دکترای علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، سال ۱۳۷۳