

The Effects of Lead on the Ultrastructure of Uterine Endometrium of Immature Balb/c mice

Mehraein F., Ph.D.*

** P.O.Box: 1449614525, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

Abstract

Purpose: Study of the effects of lead on the ultrastructure of uterine endometrium.

Materials and Methods: In this study 40 female Balb/c mice with the age of one week were divided into two control and experimental groups. The experimental group were daily injected intraperitoneally 75 microgram per gram of lead nitrate dissolved in physiological serum for two weeks. The mice of control group were received only physiological serum. After the end of the injection period, the mice were anesthetized and dissected, then their uterus were removed and divided into small pieces and transferred into karnovsky solution, After ward they were processed for electron microscope and prepared semithin and ultrathin sections. morphometry on electron micrographs were carried out by point counting and also the number of stromal cells in 50 fields of light microscope were counted too, the data was analyzed with SPSS software and student's T-Test.

Results: The endometrium epithelial cells in experimental group in comparison to control one had vacuoles inside the cytoplasm and volume fractions of nucleus to cell and mitochondria to cell were statistically different $P<0.05$ and also the mean number of the stromal cells had increased ($P<0.05$).

Conclusion: The entrance of the lead to the body from living environment in different ways can have adverse effects on the uterine endometrium.

Keywords: Lead, Endometrium, Ultrastructure, Morphometry.

تأثیر سرب بر فراساختار آندومتر رحم موش‌های نابلغ Balb/c

مهرآیین Ph.D.*

* بخش علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ وصول: مردادماه ۸۷، تاریخ پذیرش: مهرماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی تأثیر سرب بر تغییرات مورفولوژیک آندومتر رحم

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۴۰ موش ماده Balb/c یک‌هفته‌ای به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم شدند. به گروه تجربی روزانه ۷۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن نیترات سرب محلول در سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی به مدت دو هفته تزریق شد. موش‌های گروه کنترل فقط سرم فیزیولوژی دریافت کردند. بعد از پایان دوره تزریق، موش‌ها بیهوش و تشریح شدند سپس رحم آن‌ها خارج و به قطعات کوچک تقسیم شد و به محلول کارنوسکی منتقل و برای میکروسکوپ الکترونی آماده شد و برش‌های نیمه نازک و فوق نازک تهیه شد. میکروگراف‌های الکترونی با روش شماره نقطه‌ای (Point Counting) مورفومتری شد، همچنین تعداد سلول‌های استرومایی در ۵۰ میدان دید میکروسکوپ نوری شمارش شد و اطلاعات به دست آمده با آزمون Student's T-Test و نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: واکوئل‌هایی در سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیوم آندومتر در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. قسمت حجمی (Vv: Volume Fraction) هسته به سلول و میتوکندری به سلول از نظر آماری با یکدیگر تفاوت داشت و همچنین میانگین تعداد سلول‌های استرومایی افزایش نشان می‌داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: ورود سرب به بدن از طرق مختلف می‌تواند عوارضی بر آندومتر رحم داشته باشد.

کلید واژه‌ها: سرب، آندومتر، فراساختار، مورفومتری.

مقدمه

از طریق آب آشامیدنی معمولی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر در روز است. در مناطق روستایی سطح سرب هوا معمولاً کمتر از ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌متر مکعب است ولی در شهرها بسیار بالاتر بوده که این مربوط به اتومبیل‌های در حال تردد است. به علاوه سوخت‌های فسیلی و سوخت مصرفی کارخانجات مختلف به

سرب فلزی است که در گروه ۴ جدول مندلیف با خواصی که مشترک با فلزات قلیایی خاکی است جای می‌گیرد. سرب می‌تواند از راه غذا، آب و هوا وارد بدن شود که این میزان از طریق رژیم غذایی در حدود ۰/۳-۰/۲ μg و

آدرس مکاتبه: ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، بخش علوم

تشریحی، صندوق پستی: ۱۴۴۹۶۱۴۵۲۵

Email: femehra@yahoo.com

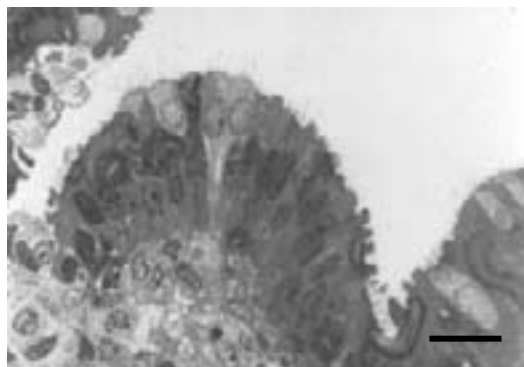
افزایش سرب موجود در هوا کمک می کنند. غلظت سرب در گرد و غبار خیابانها می تواند به ۵ میلی گرم بر گرم برسد. سرب در اسباب بازی ها، رنگ ها، لوله های سربی، بنزین، سرامیک، حشره کش ها، دود سیگار و باتری ها نیز به کار می رود، با وجود آنکه در آمریکا سرب از رنگ ها، بنزین، لوله های آب و سرامیک حذف شده است ولی هنوز در خون بچه های آمریکایی میزان قابل توجهی سرب وجود دارد [۱ و ۲]. سربی که جذب بدن می شود از طریق خون به تمام بافت های نرم انتشار می یابد و در بافت های سختی همچون استخوان ذخیره می شود [۳ و ۴]. اولین شواهد مربوط به سمیت سرب بر بدن به چهار قرن قبل از میلاد برمی گردد زمانی که نیکاندر (Nikander) پزشک یونانی یک مورد مرگ جنین در اثر مسمومیت با سرب را گزارش کرد [۱]. تأثیر سرب بر ارگان های مختلف بدن به خصوص مغز و خون توسط محققین گزارش شده است [۷-۳] ولی تأثیری که بر سیستم تناسلی می گذارد کمتر مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. به طوری که یک گزارش در مورد سیستم تناسلی مردان، کاهش تعداد سلول های اسپرماتوزئیک و اسپرم بوده است [۸]. این اثر در سیستم تناسلی زنان می تواند عمیقتر باشد، چرا که در دراز مدت تغییراتی در آندومتر رحم روی می دهد که می تواند در لانه گزینی جنین و تکامل آن و در نهایت نسل بعد تأثیرگذار باشد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی آثار سرب بر مورفولوژی آندومتر رحم موش های نابالغ نژاد Balb/c صورت گرفته است.

مواد و روش ها

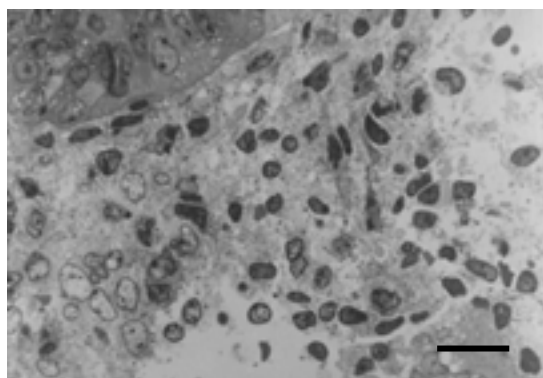
۴۰ موش ماده نژاد Balb/c یک هفته ای انتخاب شدند و در اتاق های کنترل شده با درجه حرارت 23 ± 2 درجه سانتی گراد و در قفس های تمیز نگهداری شدند. و با پلت های خریداری شده از شرکت پارس دام ایران تغذیه شدند. موش ها به طور

مساوی به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم شدند. به موش های گروه تجربی روزانه ۷۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن نیترات سرب محلول در سرم فیزیولوژی به مدت دو هفته و به طریق داخل صفاقی تزریق شد ولی موش های گروه کنترل فقط سرم فیزیولوژی دریافت کردند. بعد از پایان تزریق ها موش های دو گروه با اتر بیهوش و تشریح شدند و رحم آنها خارج و به قطعات کوچک تقسیم شد و در محلول کارنوسکی قرار داده شد. مقاطع با محلول ۰/۱ مولار فسفات بافر شستشو داده شدند و به مدت ۲ ساعت برای تثبیت ثانویه در تتراکسید اسمیوم قرار داده شدند. مقاطع پس از شستشو با فسفات بافر در درجات رو به افزایش استون آب گیری شد، سپس با رزین اپیون- استون (Epon-aceton) واپیون (Epon) ۱۰۰ درصد آغشته سازی صورت گرفت پس از این مرحله، قالب گیری در اپیون انجام گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد پلیمریزاسیون صورت گرفت. قالب های حاوی نمونه ها با اولترامیکروتوم به قطر ۵ میکرون برش گیری و با تولوئیدن بلو ۰/۵ درصد رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شد و سپس برش های فوق نازک ۶۰ نانومتری تهیه و روی گریدهای مسی قرار داده شد. سپس برش ها با یورانیل استاب به مدت ۲۰ دقیقه و سیترات سرب به مدت ۲۰ دقیقه رنگ و با میکروسکوپ الکترونی زایس مدل ۹۰۰ بررسی و عکسبرداری شد.

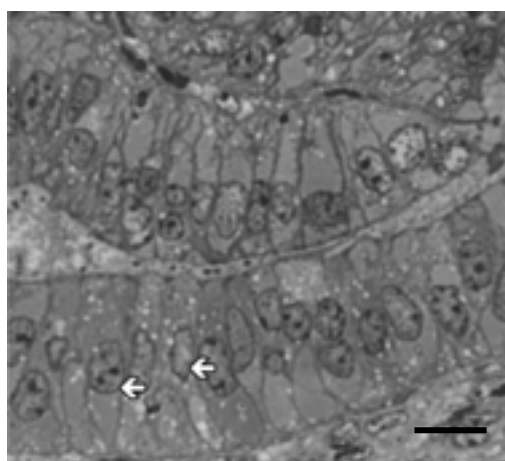
پس از آن میکروگراف های الکترونی گروه کنترل و تجربی با استفاده از روش Point Counting [۹-۱۱] مورفومتری شد. در این روش صفحه مشبک (lattice) متشکل از مربع های ۲۵ میلی متری روی میکروگراف ها قرار داده شد و نقاط قرار گرفته روی ارگانل ها و سلول ها شمارش و به صورت Volume Fraction (V_v) ذکر شد. سپس Volume Fraction میتوکندری ها به سلول و V_v هسته ها به سلول مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین تعداد سلول های استرومایی در دو گروه



شکل ۱. فتومیکروگراف سلول‌های اپی تلیال آندومتر در گروه کنترل. سلول‌ها استوانه‌ای شکل با هسته‌ای دوکی دیده می‌شوند، رنگ آمیزی: تولوئیدن بلو، بار: ۵۰ میکرون.



شکل ۲. فتومیکروگراف سلول‌های چند وجهی استرومایی در گروه کنترل. رنگ آمیزی: تولوئیدن بلو، بار: ۵۰ میکرون.



شکل ۳. فتومیکروگراف سلول‌های اپی تلیال آندومتر در گروه تجربی، هسته‌های روشن سلول‌های اپی تلیال با فلش مشخص شده‌اند، رنگ آمیزی: تولوئیدن بلو. بار: ۵۰ میکرون.

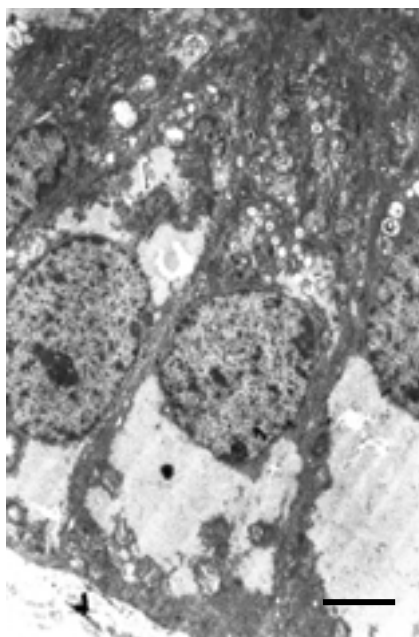
کنترل و تجربی با میکروسکوپ نوری در ۵۰ میدان دید شمارش و اطلاعات به دست آمده بین گروه‌های کنترل و تجربی به وسیله نرم افزار SPSS و Student's T-Test تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

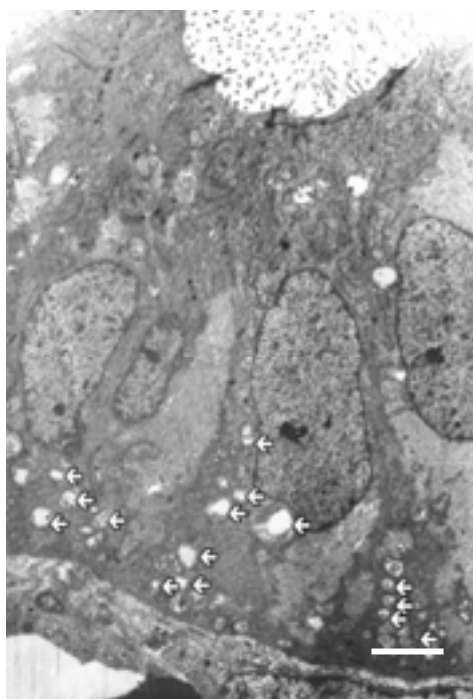
آندومتر در بررسی با میکروسکوپ نوری در گروه کنترل دارای اپی تلیوم ساده استوانه‌ای با هسته‌های دوکی شکل و استرومایی با سلول‌های چند وجهی بود (شکل‌های ۱ و ۲). در گروه تجربی هسته سلول‌های اپی تلیال روشن تر دیده شد و تعداد سلول‌های استرومایی تراکم بیشتری داشت (شکل‌های ۳ و ۴).

مشاهدات با میکروسکوپ الکترونی در گروه کنترل سلول‌های اپی تلیال استوانه‌ای با هسته‌ای حاوی یوکروماتین و فاقد واکوئل‌های سیتوپلاسمی را نشان داد (شکل ۵). سلول‌های استروما نیز به صورت چند وجهی دیده شد (شکل ۶).

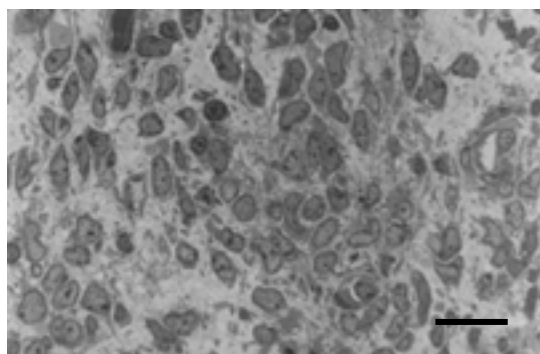
در سلول‌های اپی تلیال گروه تجربی واکوئل‌هایی درون سیتوپلاسم سلول‌ها به وجود آمده بود، به طوری که باعث به هم ریختگی نظم و ترتیب ارگانل‌ها در سلول‌ها شده بود (شکل ۷). همچنین تعداد میتوکندری‌ها افزایش نشان می‌داد (شکل ۸) و تراکم و افزایش سلول‌های استروما نیز دیده می‌شد (شکل ۹). مطالعات کمی بیانگر آن بود که (V_v) میتوکندری‌ها به سلول در گروه تجربی نسبت به (V_v) میتوکندری‌ها به سلول در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری از نظر آماری داشت. همچنین اختلاف معنی‌داری در (V_v) هسته به سلول در گروه تجربی نسبت به (V_v) هسته به سلول در گروه کنترل وجود داشت. مقایسه میانگین تعداد سلول‌های استروما در دو گروه نیز تفاوت داشت (جدول ۱ و ۲).



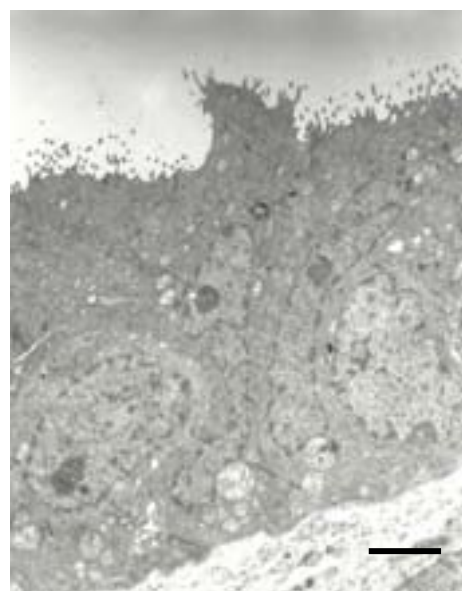
شکل ۷. میکروگراف الکترونی سلول‌های اپی‌تلیال آندومتر در گروه تجربی. به هم ریختگی نظم داخل سلولی و ظهور واکوئل‌های درون سلولی مشاهده می‌شود (پیکان‌ها)، بار: ۲/۰۱ میکرون.



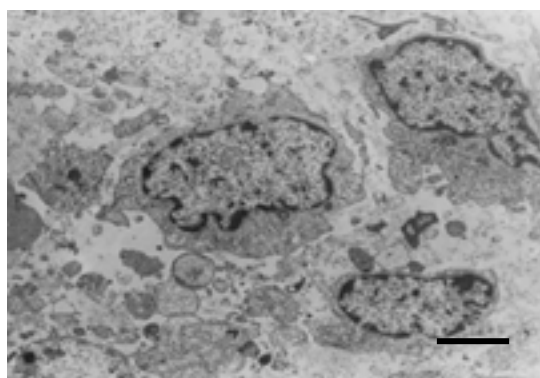
شکل ۸. میکروگراف الکترونی سلول‌های اپی‌تلیال آندومتر در گروه تجربی، پیکان‌ها تعداد زیاد میتوکندری‌ها در سلول‌ها را نشان می‌دهند، بار: ۲/۱۲ میکرون.



شکل ۹. فتومیکروگراف سلول‌های استرومای آندومتر در گروه تجربی. افزایش تعداد سلول‌های استروما مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی: تولوئیدین بلو. بار: ۵۰ میکرون.



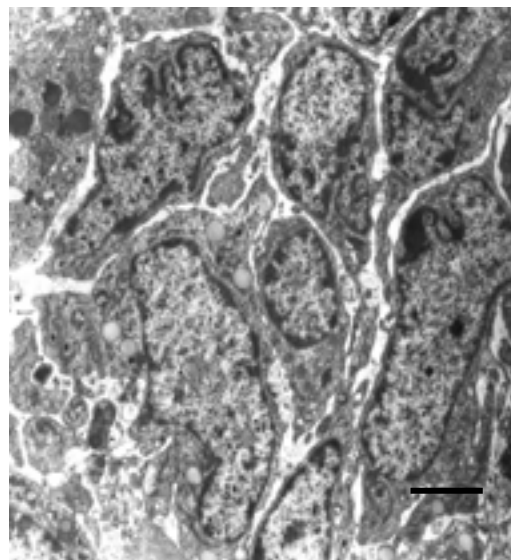
شکل ۵. میکروگراف الکترونی سلول‌های اپی‌تلیال آندومتر در گروه کنترل. سلول‌ها دارای نظم داخل سلولی و بدون واکوئل هستند. بار: ۲/۰۱ میکرون.



شکل ۶. میکروگراف الکترونی سلول‌های استرومای آندومتر در گروه کنترل. سلول‌ها با تعداد طبیعی و چند وجهی دیده می‌شوند. بار: ۵۶/۰ میکرون.

دهد، یکی از ارگان‌ها سیستم تناسلی است که حساسیت زیادی در برابر این آلاینده دارد. در این تحقیق به بررسی آثار آن بر آندومتر رحم موش‌های نابالغ Balb/c پرداخته شده است. نتایج این تحقیق دلالت بر اختلاف معنی‌دار V_v میتوکندری‌ها به سلول و V_v هسته به سلول در گروه تجربی با گروه کنترل داشت. همچنین تعداد سلول‌های استروما نیز افزایش یافته بود که تمام این تغییرات دلالت بر تحریک سلول‌ها و تغییرات درونی سلول دارد. در تحقیقاتی که صورت گرفته ذکر شده است که سرب باعث افزایش ترشح استروژن می‌شود که از عوامل تکثیر و تحریک سلولی است. همچنین هیپرتروفی اپی‌تلیوم آندومتر و ادم استروما و افزایش محتوای RNA سلولی و اتوزینوفیلی از دیگر آثار سرب بر آندومتر است [۱۳]. در تحقیقات فراساختاری و رنگ‌آمیزی ایمونو گلد مشخص شده که میتوکندری‌ها دارای رسپتورهای استروژن هستند که در تنظیم نسخه‌برداری ژن‌های میتوکندری مؤثر هستند. میتوکندری‌ها نیز با انتقال سیگنال‌هایی به هسته باعث فعال شدن عوامل درگیر در تکثیر می‌شوند. واکنش‌های بین استروژن و میتوکندری نیاز به مطالعات بیشتری دارد تا نقش میتوکندری‌ها در رشد و تکثیر سلولی مشخص شود [۲۰-۲۲]. هیپرتروفی سلول‌های اپی‌تلیال و بروز تغییرات غیرطبیعی هسته و پلی مورفیسم هسته از دیدگاه فراساختاری که بعدها منجر به نئوپلاسم‌ها خواهد شد مورد بحث است [۲۳]. در میکروآنالیزهای انجام شده با اشعه X از اپی‌تلیوم رحم در زمان لانه‌گزینی جنین در حیوانات آزمایشگاهی اثر مستقیم سرب بر اپی‌تلیوم رحم نشان داده شده است و اشاره بر ترشح سرب از ذخایر درون سلولی به لومن رحم و اثر بر بلاستوسیت دارد [۱۴].

یکی دیگر از نتایج این تحقیق افزایش سلول‌های استروما بود. واکنش‌های بین سلول‌های استرومایی و غشای پایه در تغییرات سلول‌های اپی‌تلیال مؤثر است. تغییرات سلول‌های استرومایی نیز می‌تواند بر فراساختار سلول‌های اپی‌تلیال تاثیر



شکل ۹. میکروگراف الکترونی سلول‌های استرومایی آندومتر در گروه تجربی. افزایش سلول‌ها مشاهده می‌شود، بار ۵۶ / ۰ میکرون*.

جدول ۱. Volume Fraction (V_v) میتوکندری و هسته به سلول

Volume Fraction (V_v)	گروه کنترل n=۲۰	گروه تجربی n=۲۰
میتوکندری به سلول	۰/۰۵۲±۰/۰۱	۰/۰۸۵±۰/۰۰۱*
هسته به سلول	۰/۰۷۲±۰/۰۱۸	۰/۰۹۸±۰/۰۱*

*Significant: p<0.05

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار سلول‌های استرومایی

سلول‌های استرومایی	گروه کنترل	گروه تجربی
SD±Mean	۳۶±۳	۵۴±۵*

*Significant: p<0.05

بحث

سرب یکی از آلاینده‌های محیط زیست است که به دلیل صنعتی شدن جوامع روز به روز مقدار ورود آن به محیط زیست افزایش می‌یابد، مکانیسم اثر سرب بر ارگان‌های مختلف بسیار پیچیده است [۴]؛ به‌طوری‌که در دراز مدت می‌تواند بر فعالیت سلول‌ها، رسپتورها و آنزیم‌ها تأثیر گذاشته و در نهایت بافت‌ها را به‌طرف بروز علائم پاتولوژیک سوق

بگذارد [۲۵].

در تحقیق دیگری میزان سرب موجود در خون ۱۴۲۵ نفر از زنان ۲۰-۴۹ ساله که باردار و شیرده نبودند از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۲ مورد بررسی قرار گرفت، در این میان زنانی که سابقه آندومتریوز و میوم داشتند دارای میزان سرب بالاتری در خون نسبت به زنان سالم بودند [۱۵]. مطالعات انجام شده روی میمون‌های رزوس (Rhesus monkeys) نشان داده است که ریسک آندومتریوز در اثر سرب افزایش می‌یابد [۱۶ و ۱۷]. همچنین مادرانی که میزان سرب بیشتری در خون خود دارند از طریق شیر دادن پستانی می‌توانند این آلاینده را به بدن نوزاد وارد نمایند که بر سیستم تناسلی نوزاد تأثیر خواهد

گذاشت [۱۸ و ۱۹]. به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که ورود سرب به بدن از طرق مختلف و به طور مزمن تا قبل از بلوغ می‌تواند عملکرد محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - تخمدان را تحت تأثیر قرار دهد که بعدها در طول زندگی بیماری‌های سیستم تناسلی را به وجود آورد، به‌ویژه که با تغییر ترشح گونادوتروپین‌ها عملکرد رسپتورهای سلولی سیستم تناسلی نیز تغییر می‌یابد [۱۵].

تقدیر و تشکر

از پرسنل بخش میکروسکوپ الکترونی بیمارستان بقیه‌ا. برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی قدردانی می‌شود.

References

1. Nolan CV, Sheikh ZA. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology* 1992; 73: 127-46.
2. Meng XM, Ruan Dy, Kang LD, Zhu DM, She JQ, Luo le, et al. Age-related morphological impairments in the rat hippocampus following developmental Lead exposure: an MRI, LM and EM study. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003; 13 (3): 187-97.
3. Soltaninejad K, Kebriaeezadeh A, Minaiee B, Ostad SN, Hosseini R, Azizi E, et al. Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22(8): 417-23.
4. Kang JK, Sul D, Nam SY, Kim HJ, Lee E. Effects of lead exposure on the expression of phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase mRNA in the rat brain. *Toxicol Sci* 2004; 82 (1): 228-36.
5. Allen P. Accumulation profiles of lead and cadmium in the edible tissues of oreochromis aureus during acute exposure. *Journal of Fish Biology* 2005; 47 (4): 559-568.
6. Zraly Z, Pisarikova B, Trchova M, Navratilova M. Effects of humic acid on lead concentration in chicken organs and muscles. *Acta Vet Brno* 2008; 79: 439-45.
7. Somero GN, Tsaihwa J, Chow PH, Carrie BS. Lead accumulation rates in tissues of the estuarine teleost fish, *Gillichthys mirabilis*: salinity and temperature effects. *Arch Environ Contam Toxicol* 1977; 6(1): 337-48.
8. Alomar MA, Abbas AK, Alobaiody SA. Combined effect of exposure to lead and Chlordane on the testicular tissues of Swiss mice. *Toxicol let* 2000; 115 (1): 1-8.
9. Taha AA, Abdolla MA. Ultrastructural morphometric observations on the extramural aortico-pulmonary bodies of the domestic fowl. *J Anat* 1988; 157: 169-73.
10. Oguzhan O, Shahin Conkur E, Sari M. Shtereom 1 simple windows based software for stereology, volume and number estimated. *Image Anal Stereol* 2007; 26: 45-50
11. Weibel ER, Gomez DM. A principal for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* 1962; 17: 343-8.
12. Cook PS, Buchanan DL, Setiawan T, Brody J,

- Kovach KS, Taylor J, et al.** Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *PNAS* 1997 (June); 4(12): 6535-40.
13. **Tchernitchin Nina N, Clavero A, Mena Minguel A, Unda C, Villagra R, Cumsille M, et al.** Effect of chronic exposure to lead on estrogen action in the prepubertal rat uterus. *Environ Toxicol* 2003; 18(4): 267-77.
 14. **Nilsson O, Ljung L, Wide M.** Electron microscopy and X-Ray microanalyses of uterine epithelium from lead-injected mice in an experimental delay of implantation. *Arch Toxicol* 1991; 65 (3): 239-43.
 15. **Jakson LW, Zullo MD, Goldberg JM.** The association between heavy metals, endometriosis and uterine myomas among premenopausal women: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Hum Reprod* 2008; 23(3): 679-87.
 16. **Foster WG, Stals SI, McMahon A.** An Ultrasound study of the effects of chronic lead exposure on endometrial cycle changes in the female cynomolgus monkey. *J Med Primatol* 1992 (Sep-Oct); 21 (7-8): 353-6.
 17. **Krugner-Higby L, Rosenstein A, Handschke L, Luck M, Laughlin NK, Mahvi D, et al.** Inguinal hernias, endometriosis and other adverse outcomes in rhesus monkeys following lead exposure. *Neurotoxicol Teratol* 2003; 25: 561-70.
 18. **Dorea JG.** Mercury and Lead during breast-feeding. *Br J Nutr* 2004; 92: 21-40.
 19. **Dorea JG, Donangelo CM.** Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. *Clin Nutr* 2006; 25 (3): 369-76.
 20. **Felty Q, Roy D.** Estrogen, mitochondria and growth of cancer and non cancer cells. *J Carcinog* 2005; 4(1):1-44.
 21. **Yang SH, Liu R, Perez EJ, Weny Smj, Valencia T, Burn-zinkernagel AM, et al.** Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Nati Acad Sci USA* 2004;101:4130-5.
 22. **Casas F, Daury L, Grandemange S, Busson M, Seyer P, Hatier R, et al.** Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated Rx ralpa and c-erb alpha II proteins. *FASEB J* 2003;17: 426-36.
 23. **Nickerson JA.** Nuclear dreams: The malignant alteration of nuclear architecture. *J Cell Biochem* 1998; 70: 172-80.
 24. **DeRosa C, Richter P, Pohl H, Jones DE.** Environmental Exposures that affect the endocrine system: Public Health Implications. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1998; 1: 3-26.
 25. **Hendry W, Sheehan DM, Khan SA, May JV.** Developing laboratory animal model for perinatal endocrine disruption: *Exp Biol Med* 2002; 227: 709-23.
 26. **Sharma R, Bajpal SU, Balapur AK.** Histological and ultrastructural regulation in rabbit endometrial explants by estrogen in serum free culture. *Invitro Cel Dev Biol Anim* 2002; 38(5): 293-7.