

ارزیابی روند تغییرات فعالیت آلکالین فسفاتاز آندومتر موش پس از تحریک تخمک گذاری طی دوران ابتدای بارداری طبیعی و کاذب تا زمان لانه‌گزینی

© هانف قاسمی حمیدآبادی *M.Sc.، مژده صالح‌نیا *Ph.D.، سیده زهرا بطحایی *Ph.D.

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: شهریورماه ۸۴، تاریخ پذیرش: مهرماه ۸۴

چکیده

هدف: تعیین الگوی فعالیت آنزیم ALP: Alkaline Phosphatase رحم موش پس از تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از PMSG: Pregnant more Serm Gonadotropin و hCG: human Chorionic Gonadotropin نسبت به گروه شاهد طی دوران ابتدای بارداری طبیعی و کاذب.

مواد و روشها: ۲۴۰ سر موش ماده نژاد NMRI با سن بین ۱۰-۶ هفته انتخاب و به‌صورت تصادفی به دو گروه شاهد و تحریک شده تقسیم شدند سپس در هر گروه زیرگروه‌های باردار به روش طبیعی و کاذب در نظر گرفته شد. برای القای بارداری کاذب از تحریک مکانیکی واژن استفاده شد. روزانه ۵ سر موش در هر گروه به ترتیب از روز اول تا ششم به طریق جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند. و به منظور ارزیابی‌های بیوشیمیایی نمونه‌هایی از شاخه‌های رحم جدا شد، پس از هموژن و سانتریفوژ کردن نمونه‌ها (با دور ۱۴۰۰g) و در معرض قرار دادن سوبسترای پارانیتروفیل فسفات، فعالیت آنزیم تعیین و مقدار پروتئین، فعالیت ویژه ALP برحسب واحد U/mg محاسبه شد. برای تعیین معنی‌دار بودن اختلافات از آزمون Mann Whithney استفاده شد. در بررسی‌های هیستوشیمیایی نمونه‌ها از یک سوم میانی یکی از شاخه‌های رحم برداشت شد و با استفاده از دستگاه کرایواستات برشهای به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و با روش Azo-coupling و سوبسترای آلفا - نفتول فسفات واکنش ALP مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان داد که تغییرات فعالیت آنزیم در مطالعات بیوشیمیایی با مطالعات هیستوشیمیایی در کلیه گروه‌ها مطابقت داشت. روند تغییرات فعالیت ویژه آنزیم ALP در گروه‌های شاهد و تحریک شده باردار به روش طبیعی از روز اول تا ششم افزایش داشت ولی در گروه‌های شاهد و تحریک شده باردار کاذب تا روز چهارم که معادل زمان لانه‌گزینی بلاستوسیست است افزایش و پس از آن کاهش پیدا کرد شدت واکنش آنزیم در بخش آپیکال غشای پلاسمایی سلولهای اپی‌تلیال سطحی و غددی آندومتر بیشتر از بقیه بخشها بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که تحریک تخمک‌گذاری سبب تغییر در الگوی فعالیت آنزیم ALP آندومتر طی بارداری اولیه و در زمان نزدیک به لانه‌گزینی می‌شود که احتمالاً می‌تواند بر فرآیند لانه‌گزینی جنین تأثیر بگذارد هرچند که به مطالعات بیشتری در این خصوص با استفاده از روشهای دیگر نیاز است.

کلیدواژه‌ها: آنزیم آلکالین فسفاتاز، تحریک تخمک‌گذاری، رحم، بارداری کاذب، زمان لانه‌گزینی

مقدمه

سلولهای اپی تلیومی آندومتر اولین محل تماس و برخورد جنین در حین لانه‌گزینی است مطالعات نشان می‌دهد که در زمان لانه‌گزینی پستانداران غشای رأسی اپی‌تلیوم سطحی آندومتر دستخوش تغییرات اساسی می‌شود که تحت عنوان «تغییر شکل غشای پلاسمایی» (Plasma membrane transformation) نامیده می‌شود [۱ و ۲]. از مهمترین آنها می‌توان به تغییر زواید سطح سلولی یعنی کوچک شدن و کاهش تعداد میکروویلی اشاره کرد که همزمان زواید قارچی شکل دیگری به نام پینوپودها ظاهر می‌شوند. همچنین قطبیت سلولها، بار منفی و ضخامت گلیکوکالیکس سطح سلول کاهش یافته که همراه با افزایش ذرات پروتئینی داخل غشایی است [۳-۶] و همگی متأثر از هورمونهای استروئیدی تخمدان است [۷].

با توجه به تغییرات غشای رأسی سلولهای اپی‌تلیال طی بارداری اولیه به نظر می‌رسد که آنزیمهای واقع در این سطوح تغییر کرده و در روند لانه‌گزینی نقش به‌سزایی داشته باشند. یکی از مهمترین این آنزیمها، آلکالین فسفاتاز (ALP) است که گلیکوپروتئین سطح سلول است که در هیدرولیز استرهای خارج سلولی نقش دارد و به‌طور گسترده‌ای در تمام بافتهای مهره‌داران از جمله ارگانهای تناسلی نظیر رحم یافت می‌شود [۸ - ۱۰] و می‌تواند با انتقال کربوهیدراتها، پروتئینها و اسیدهای آمینه در تغذیه و تکوین بلاستوسیست مؤثر باشد. تحقیقات نشان داد که فعالیت آنزیم طی بارداری اولیه و به‌خصوص در هنگام لانه‌گزینی تغییراتی داشته که مسلماً این تغییرات در ارتباط با قدرت پذیرندگی آندومتر و لانه‌گزینی جنین است [۱۱]. هرچند که در این رابطه نظرات متفاوتی با توجه به گونه‌های مختلف پستانداران اظهار شده است [۱۵-۱۲]. گزارشهایی مبنی برافزایش فعالیت ALP رحم در زمان لانه‌گزینی ذکر شده است [۱۶] در همین ارتباط ماردوچ (Murdoch) و همکارانش نشان دادند که فعالیت آنزیم ALP رحم در حوالی لانه‌گزینی، به تدریج افزایش یافته و حداکثر فعالیت آنزیم در روز هفتم بوده و سپس فعالیت تا روز

چهاردهم کاهش می‌یابد. بوگالیا (Bugalia) و همکارانش فعالیت آنزیمهای فسفاتاز از جمله آلکالین فسفاتاز را در رحم بوفالو طی سیکل استروس بررسی کردند. [۷] یافته‌های آنها حاکی از آن بود که فعالیت اختصاصی آنزیم ALP رحم طی فاز فولیکولار کمتر از فاز لوتئال بوده و به ترتیب توسط استروژن و پروژسترون کنترل می‌شود. بانسود (Bansode) و همکارانش با به‌کارگیری تکنیکهای هیستوشیمیایی اظهار داشتند که در زمان لانه‌گزینی رت فعالیت ALP آندومتر در سلولهای اپی‌تلیال لومینال، غده‌ای و استروما افزایش یافت. استنباط آنها چنین بود که بین حداکثر پذیرندگی آندومتر و فعالیت بالای ALP رابطه‌ای وجود دارد و این فعالیت را به‌عنوان بهترین نشانه پذیرندگی رحم مطرح کردند [۱۴]. بین وضعیت هورمونی، تغییرات مورفولوژیکی و فعالیت آنزیمی در سلولهای آندومتر ارتباطاتی وجود دارد [۱۷]. ترکیبات گوناگونی از جمله آنزیمها در ساختار سطح آپیکال سلولهای اپی‌تلیال وجود داشته که در فرایند لانه‌گزینی نقش دارد. بنابراین به نظر می‌رسد که کنترل هورمونی این ترکیبات می‌تواند در روند تماس جنین و آندومتر نقش داشته باشد. از آنجایی که آنزیم ALP یکی از آنزیمهای شاخص گلیکوکالیکس است که به‌طور همزمان با تغییرات گلیکوکالیکس تغییراتی نیز در سطح فعالیت آنزیم مشاهده شد پس می‌تواند در روند لانه‌گزینی نقش داشته باشد [۷]. با توجه به افزایش ناگهانی مقدار استروژن و پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری و وابستگی فعالیت آنزیمها به مقدار هورمونهای تخمدانی، ممکن است تغییرات زیادی در روند فعالیت ALP به وجود آید در همین ارتباط نتایج مطالعه انجام شده قبلی توسط عمادی و صالح‌نیا که فقط با به‌کارگیری روش هیستوشیمیایی در روزهای سوم و چهارم به بررسی تغییرات ALP در نمونه‌های تحریک شده و شاهد پرداخته بودند نشان داد که در گروههای تحریک شده میزان فعالیت آنزیم کمتر از گروه شاهد بود [۱۸ و ۱۹]. بنابراین با توجه به اطلاعات مختصر درخصوص فعالیت ALP طی ابتدای بارداری تا زمان لانه‌گزینی و همچنین تأثیر تحریک تخمک‌گذاری بر فعالیت این آنزیم سعی شد در این تحقیق با

روش بیوشیمیایی

در روش بیوشیمیایی از ۱۲۰ سر موش ماده نژاد NMRI استفاده شد و در هر گروه روزانه ۵ سر موش در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم از روز اول تا ششم بررسی شد. جانوران به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و شاخه‌های رحم به‌عنوان نمونه رحمی انتخاب شد.

پس از تهیه نمونه و نگهداری آنها در ظرف یخ توسط تیغ بیستوری تا حد امکان به قطعات ریزی تقسیم شدند و به لوله آزمایشی که تقریباً دو برابر حجم نمونه بافر Tris 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 ۴° سانتی‌گراد و با دور ۱۴۰۰۰ g سانتریفوژ شدند، سوپ رویی از محلول استخراج شده و برای بررسی فعالیت آنزیم استفاده شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت بیوشیمیایی (شماره کاتالوگ ۱۰-۵۰۳: Catno ساخت شرکت زیست شیمی) محاسبه شد. پروتئین کل با استفاده از کیت بیوشیمیایی پروتئین کل (محصول شرکت شیم آنزیم) بررسی شد و در نهایت فعالیت اختصاصی آنزیم بر اساس میزان فعالیت آنزیم بر mg پروتئین محاسبه شد. داده‌های تحقیق حاضر با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون Mann Whitheny محاسبه شد.

روش هیستوشیمیایی

در مطالعات هیستوشیمیایی نیز از ۱۲۰ سر موش ماده نژاد NMRI استفاده شد و ۵ سر موش از هر گروه برای هر روز در نظر گرفته شد یک سوم میانی یکی از شاخه‌های رحمی برداشته شد. ابتدا از فویل‌های آلومینیومی قالبهای استوانه‌ای تهیه شد (به قطر ۱ cm و ارتفاع ۲ cm)، قالبها از چسب OCT پر شده و بلافاصله بعد از برداشت نمونه، آن را در قالب به‌صورت عمودی قرار داده و روی بخار ازت به مدت یک دقیقه نگه

به کارگیری موشهای سوری نژاد NMRI و با استفاده از روش بیوشیمیایی و هیستوشیمیایی تغییرات فعالیت آنزیم ALP طی دوران ابتدای بارداری موشهای باردار نرمال و کاذب که در دو گروه تحریک شده و تحریک نشده قرار داشتند تا روز ششم بررسی شود و به سؤالات زیر پاسخ مناسبی داده شود:

روند فعالیت ALP آندومتر طی ابتدای بارداری به‌عنوان یک

مدل) تا زمان لانه‌گزینی چگونه است؟

آیا تحریک تخمک‌گذاری تخمدان باعث تغییر فعالیت آنزیم ALP آندومتر طی ابتدای بارداری در مقایسه با گروه شاهد می‌شود؟

آیا تفاوتی بین فعالیت آنزیم ALP آندومتر در گروههای باردار نرمال با باردار کاذب دیده می‌شود یا نه؟

مواد و روشها

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

به منظور تحریک تخمک‌گذاری ۱۰ واحد، PMSG به طریق داخل صفاقی و ۴۸ ساعت بعد به همان روش ۱۰ واحد دیگر hCG تزریق شد. موشهای ماده در دو گروه تحریک شده (پس از تزریق hCG) و گروه شاهد (در ساعت پنج بعد از ظهر) 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 باردار کاذب توسط یک سوپ که چندین بار در دهانه واژن چرخانده شد انجام شد [۱۸].

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

یافت. مقایسه فعالیت اختصاصی ALP در دو گروه مذکور نشان داد که تغییرات در روزهای ۴، ۵ و ۶ از لحاظ آماری معنی‌داری ($P < 0.05$) بود ولی در سایر روزها معنی‌دار نبود. در گروه شاهد باردار 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 باردار طبیعی و گروه شاهد باردار کاذب حاکی از آن بود که فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه باردار طبیعی بیشتر از گروه باردار کاذب بود به طوری که اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) در تمام روزها وجود داشت. در گروه تحریک شده و باردار کاذب الگوی فعالیت اختصاصی آنزیم در روزهای دوم، سوم و چهارم بیشتر بود ولی در سایر روزها کمتر بود. یافته‌های آماری حاصل از مقایسه روزانه فعالیت مخصوص آنزیم در گروه شاهد باردار کاذب و گروه تحریک شده و باردار کاذب حاکی از آن بود که تغییرات فعالیت اختصاصی آنزیم در روزهای اول، دوم، چهارم و پنجم معنی‌دار بود ($P < 0.05$). ولی در سایر روزها معنی‌دار نبود. همچنین آنالیز آماری نتایج به دست آمده از مقایسه فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه تحریک شده و باردار طبیعی و تحریک شده باردار کاذب نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($P < 0.005$) در اکثر روزها وجود داشت.

نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپ نوری حاکی از آن است که فعالیت آنزیم ALP آندومتر در اپی‌تلیوم (سطحی و غددی)، لامینا پروپریا (استروما) و میومترיום دیده شد. محل‌های واکنش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به شکل مناطق قرمز رنگ مشاهده شد. محل‌های فعالیت آنزیم در اپی‌تلیوم سطحی، غددی و لامینا پروپریا بررسی شد، فعالیت آنزیم در دو ناحیه از اپی‌تلیوم مشاهده شد یکی در سطح آپیکال و دیگری در سطح بازال. فعالیت آنزیم در اپی‌تلیوم سطحی گروه شاهد باردار به روش طبیعی از روز اول تا ششم در هر دو سطح آپیکال و بازال افزایش داشت (شکل ۱).

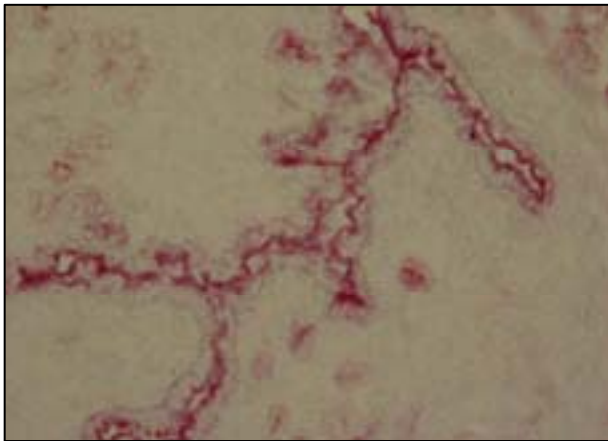
داشته تا OCT به شکل جامد در آید و سپس به دستگاه کرایوستات منتقل شد. با استفاده از دستگاه کرایوستات مدل CM ۱۸۵۰ و با شرایط برودت محفظه $27^{\circ}C$ - سانتی‌گراد برشهای به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. در هر گروه ۵ بلوک و از هر بلوک حداقل ۱۰-۵ برش تهیه شده و سپس رنگ آمیزی هیستوشیمیایی انجام و چندین فیلم از هر برش بررسی کیفی شد.

رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با استفاده از کیت ALP (شماره کاتالوگ ۸۶ شرکت Sigma) که براساس روش AZO-coupling بود، انجام شد. ابتدا برشها در محلول تثبیت کننده که شامل سیترات، استن و فرمالدئید به مدت یک دقیقه تثبیت شدند و قبل از خشک شدن نمونه‌ها در محلول سوپسترای آلفا نفتول فسفات و نمک دیازونیوم به مدت ۳۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و پس از رنگ آمیزی، لامها توسط میکروسکوپ نوری Olympus مشاهده و عکس‌برداری شد. مناطقی که فعالیت آنزیم وجود داشت به شکل قرمز دیده شد. به منظور تعیین حداقل فعالیت آنزیم (واکنش صفر) برشی از بافت آندومتر مطابق مراحل فوق رنگ‌آمیزی شد، با این تفاوت که نمونه‌ها به مدت یک ساعت قبل از رنگ‌آمیزی در شرایط دمایی $60^{\circ}C$ سانتی‌گراد انکوبه شدند تا فعالیت آنزیم به وسیله گرما مهار شود. همچنین برای کنترل مثبت از برشهای روده کوچک استفاده شد. در ارزیابی میکروسکوپی نمونه‌ها، حداکثر واکنش آنزیم با +۴ و حداقل واکنش با صفر مشخص شد و واکنشهای حدواسط به‌طور نسبی بین اعداد فوق در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مطالعات بیوشیمیایی

خلاصه‌ای از فعالیت اختصاصی آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های رحمی گروه‌های تحریک شده و شاهد در جدول ۱ درج شده است. یافته‌های به دست آمده نشان داد که فعالیت اختصاصی ALP در گروه شاهد باردار طبیعی و گروه تحریک شده باردار طبیعی به‌صورت خطی از روز اول تا ششم افزایش



شکل ۲. تصویر آندومتر رحم موش، گروه شاهد باردار کاذب در روز چهارم. پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی آلکالین فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط صورتی تا قرمز در بخش آپیکال و بازال سلولهای اپی تلیالی لومینال و غده‌ای قابل مشاهده است. بزرگنمایی: $\times 100$

شکل ۱. تصویر آندومتر رحم موش، گروه شاهد باردار طبیعی در روز دوم. پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی آلکالین فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط صورتی تا قرمز در بخش آپیکال و بازال سلولهای اپی تلیالی لومینال و غده‌ای قابل مشاهده است. بزرگنمایی: $\times 100$

جدول ۱ میانگین و مقایسه روزانه فعالیت اختصاصی ALP (U/mg) در نمونه‌های استخراج بافتی رحمی در گروه‌های

تحریک شده و تحریک نشده (نتایج مطالعات هیستوشیمیایی)

روز ششم	روز پنجم	روز چهارم	روز سوم	روز دوم	روز اول*	روز حاملگی / گروه‌های مورد مطالعه
$2/584 \pm 0/089$ c	$2/377 \pm 0/077$ c	$2/843 \pm 0/048$ c	$2/110 \pm 0/127$ a	$1/499 \pm 0/147$ a	$1/300 \pm 0/120$ a	گروه شاهد باردار طبیعی
$0/542 \pm 0/125$ a	$1/079 \pm 0/031$ a	$2/170 \pm 0/030$ a	$1/162 \pm 0/205$ a	$0/800 \pm 0/111$ a	$0/581 \pm 0/120$ a	گروه شاهد باردار کاذب
$4/636 \pm 0/286$ a	$3/073 \pm 0/205$ a	$2/422 \pm 0/126$ a	$2/040 \pm 0/158$ c	$1/530 \pm 0/114$ b	$1/186 \pm 0/129$ bc	گروه تحریک شده باردار طبیعی
$0/405 \pm 0/095$ c	$0/687 \pm 0/170$ bc	$1/460 \pm 0/125$ bc	$1/333 \pm 0/218$ c	$1/668 \pm 0/183$ b	$0/962 \pm 0/166$ bc	گروه تحریک شده باردار کاذب

a: وجود اختلاف معنی دار با گروه شاهد باردار طبیعی، b: وجود اختلاف معنی دار با گروه شاهد باردار کاذب، c: وجود اختلاف معنی دار با گروه

تحریک شده و باردار طبیعی * اعداد بصورت mean \pm SD است

واکنش آنزیم در تمام روزها با اپی تلیوم سطحی مشابه بود که خلاصه‌ای از این نتایج در جدول ۲ آورده شده است. محدوده تغییرات واکنش آنزیم گروه شاهد باردار کاذب در روز سوم

حداقل و حداکثر واکنش در روز سوم بین ۲+ و ۳+ و در روزهای چهارم بین ۳+ و ۴+ مشاهده شد. دامنه تغییرات واکنش آنزیم در اپی تلیوم غددی بین ۰ و ۴+ متغیر بود، شدت

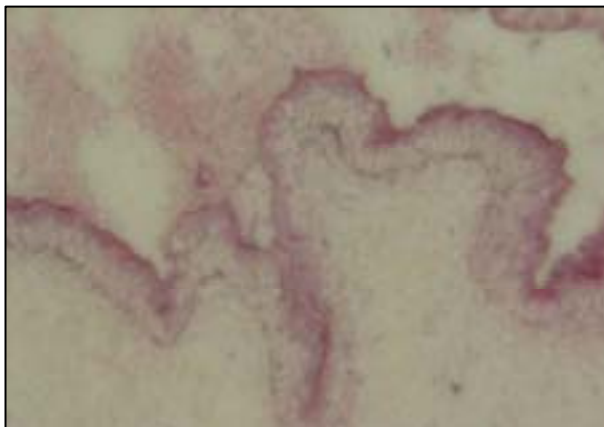
بین ۲+ و ۳+ متغیر بود و ۴۰ درصد نمونه‌ها حداکثر واکنش را نشان دادند. دامنه تغییرات شدت واکنش آنزیم در روز چهارم بین ۳+ و ۴+ متغیر بود، و ۲۰ درصد از نمونه‌ها حداکثر شدت را نشان دادند. در اپی تلیوم غددی شدت فعالیت آنزیم مشابه با اپی تلیوم سطحی بود (جدول ۲ و شکل ۲).

جدول ۲ ارزیابی شدت واکنش آنزیم ALP، در برشهای بافتی آندومتر از روز اول تا ششم در گروههای مورد نظر

گروه‌های مورد مطالعه	جایگاه فعالیت آنزیم	اپی تلیوم سطحی		اپی تلیوم غددی		لامینا پروپریا	
		حداقل واکنش*	حداکثر واکنش	حداقل واکنش	حداکثر واکنش	حداقل واکنش	حداکثر واکنش
روز اول	روز بارداری	۰ (۲۰)	+۱ (۸۰)	۰ (۶۰)	+۱ (۴۰)	۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
		۰ (۴۰)	+۱ (۶۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)	۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
		۰ (۴۰)	+۱ (۶۰)	۰ (۶۰)	+۱ (۴۰)	۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
		+۱ (۸۰)	+۲ (۲۰)	۰ (۲۰)	+۱ (۸۰)	۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
روز دوم	روز بارداری	+۱ (۴۰)	+۲ (۶۰)	۰ (۲۰)	+۱ (۸۰)	۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
		+۱ (۶۰)	+۲ (۴۰)	+۱ (۶۰)	+۲ (۴۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
		+۱ (۸۰)	+۲ (۲۰)	۰ (۲۰)	+۱ (۸۰)	۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
		+۲ (۴۰)	+۳ (۶۰)	+۲ (۲۰)	+۳ (۸۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
روز سوم	روز بارداری	+۲ (۶۰)	+۳ (۶۰)	+۱ (۸۰)	+۲ (۲۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
		+۲ (۶۰)	+۳ (۴۰)	+۳ (۶۰)	+۴ (۴۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
		+۲ (۸۰)	+۳ (۲۰)	+۱ (۴۰)	+۲ (۶۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
		+۲ (۸۰)	+۳ (۲۰)	+۲ (۴۰)	+۳ (۶۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
روز چهارم	روز بارداری	+۳ (۶۰)	+۴ (۴۰)	+۳ (۴۰)	+۲ (۸۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
		+۳ (۸۰)	+۴ (۲۰)	+۳ (۴۰)	+۴ (۶۰)	۰ (۶۰)	+۱ (۴۰)
		+۲ (۶۰)	+۳ (۴۰)	+۲ (۶۰)	+۳ (۴۰)	۰ (۶۰)	+۱ (۴۰)
		+۲ (۸۰)	+۳ (۲۰)	+۳ (۴۰)	+۴ (۶۰)	۰ (۶۰)	+۱ (۴۰)
روز پنجم	روز بارداری	+۲ (۴۰)	+۲ (۶۰)	+۳ (۸۰)	+۴ (۲۰)	۰ (۶۰)	+۱ (۴۰)
		+۱ (۴۰)	+۲ (۶۰)	+۱ (۴۰)	+۲ (۶۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
		+۳ (۴۰)	+۴ (۶۰)	+۳ (۸۰)	+۴ (۲۰)	۰ (۲۰)	+۱ (۸۰)
		+۱ (۴۰)	+۲ (۶۰)	+۱ (۶۰)	+۲ (۴۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)
روز ششم	روز بارداری	+۳ (۲۰)	+۴ (۸۰)	+۳ (۶۰)	+۴ (۴۰)	(۶۰)	+۱ (۴۰)
		۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)	۰ (۴۰)	+۱ (۶۰)	۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
		۰ (۰)	+۴ (۱۰۰)	۰ (۰)	+۴ (۱۰۰)	۰ (۲۰)	+۱ (۸۰)
		+۱ (۶۰)	+۲ (۴۰)	۰ (۴۰)	+۱ (۶۰)	۰ (۸۰)	+۱ (۲۰)

* درصد شدت واکنش در برشهای بافتی هر گروه در همان روز محاسبه شد اعداد داخل پرانتز بصورت درصد است.

مشاهده شد به طوری که ۲۰ درصد از نمونه‌ها واکنش +۳ داشتند. دامنه تغییرات شدت واکنش آنزیم در اپی‌تلیوم غددی بین ۰ و +۴ متغیر بود و با اپی‌تلیوم سطحی مشابه بود، همچنین در روزهای دوم و سوم نیز مشابه با اپی‌تلیوم سطحی بود (+۲)، هرچند که در روز چهارم دامنه تغییرات شدت واکنش آنزیم (+۳ و +۴) مشابه با اپی‌تلیوم سطحی بود ولی حداکثر شدت واکنش آنزیم در ۶۰ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد (برخلاف اپی‌تلیوم سطحی که تنها در ۲۰ درصد از نمونه‌ها دیده شد) (جدول ۲ و شکل ۴). در تمام نمونه‌ها، واکنش آنزیم در بافت استرومایی بسیار ضعیف بود (بین ۰ و ۱ متغیر بود) ولی در بخش میومتریم حداکثر شدت را نشان داد (+۴)

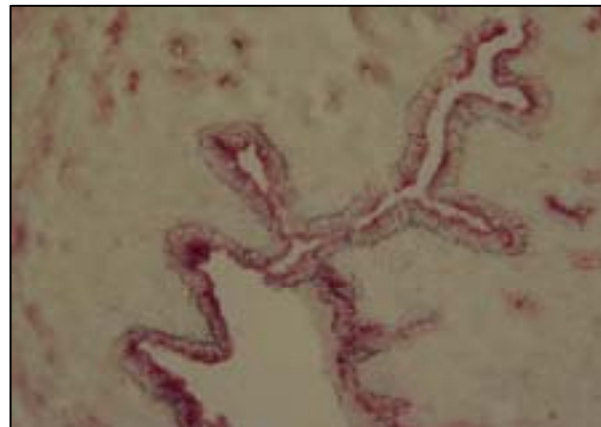


شکل ۴. تصویر آندومتر رحم موش، گروه تحریک شده و بارداری کاذب در روز سوم.

پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی آلکالین فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط صورتی تا قرمز در بخش آپیکال و بازال سلولهای اپی‌تلیالی لومینال و غده‌ای قابل مشاهده است. بزرگنمایی: $\times 400$

در اپی‌تلیوم لومینال و غده‌ای متغیر ولی در میومتریم ثابت و شدید (+۴) بود. علاوه بر این شدت واکنش آنزیم در بخش استرومایی بسیار پایین بود و طی بارداری اولیه تغییرات اندکی داشت. بنابراین تغییرات فعالیت آنزیم به طور محسوسی در بخش اپی‌تلیال قابل مشاهده بود. یافته‌ها نشان داد که در بارداری طبیعی فعالیت آنزیم ALP حوالی زمان لانه‌گزینی در سطوح آپیکال و بازال سلولهای اپی‌تلیالی آندومتر افزایش داشت. در واقع در این دو محل بیشترین سطح تبدلات انجام

طیف وسیعی از تغییرات فعالیت آنزیم در اپی‌تلیوم سطحی گروه تحریک شده بارداری به روش طبیعی مشاهده شد (۰ تا +۴) در روز سوم و چهارم محدوده تغییرات واکنش آنزیم بین +۲ و +۳ بود و در روز سوم حداکثر شدت واکنش (+۳) فقط در ۲۰ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد ولی در روز چهارم در ۴۰ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد. الگوی تغییرات واکنش آنزیم در اپی‌تلیوم غددی به غیر از روز دوم که بین ۰ و +۱ و روز سوم که بین +۱ و +۲ متغیر بود، در سایر روزها با اپی‌تلیوم سطحی مشابه بود (جدول ۲ و شکل ۳). دامنه تغییرات شدت واکنش آنزیم اپی‌تلیوم سطحی در گروه تحریک شده بارداری کاذب در روزهای سوم و چهارم بین +۲ و +۳



شکل ۳. تصویر آندومتر رحم موش، گروه تحریک شده و بارداری کاذب در روز پنجم.

پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی آلکالین فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط صورتی تا قرمز در بخش آپیکال و بازال سلولهای اپی‌تلیالی لومینال و غده‌ای قابل مشاهده است. بزرگنمایی: $\times 400$

بحث

یافته‌های به دست آمده نشان داد که تغییرات فعالیت آنزیم در مطالعات بیوشیمیایی با مطالعات هیستوشیمیایی در کلیه گروهها مطابقت داشت. واکنش آنزیم ALP عمدتاً در بخش آپیکال سلولهای اپی‌تلیال آندومتر (سطحی و غددی) مشاهده شد، هرچند که واکنش آنزیم در سطح بازال سلولهای اپی‌تلیالی نیز دیده شد. شدت رنگ حاصل در روزهای مختلف بارداری

تروفواکتودرم که سیگنالهای جنینی را می‌فرستند [۲۵]. هر چند که نتایج متفاوت دیگری در گونه‌های مختلف ارائه شده است. [۱۶ و ۲۵]

از سوی دیگر نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در گروه شاهد بارداری کاذب تغییرات فعالیت آنزیم اغلب در بخش اپی‌تلیالی است و فعالیت آنزیم تا روز چهارم که همزمان با شروع لانه‌گزینی در موش است افزایش و سپس کاهش پیدا کرد. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم ALP تا زمان لانه‌گزینی بیشتر وابسته به سلولهای اپی‌تلیالی آندومتر است تا حضور بلاستوسیست، هرچند که این موضوع در زمان بعد از لانه‌گزینی به هر دو عامل بستگی خواهد داشت که یکی از علل این کاهش پس از زمان لانه‌گزینی می‌تواند مربوط به نبود بافت دسیدوایی مناسب در حد نمونه‌های بارداری طبیعی باشد یا به عبارتی واکنش دسیدوایی حاصله در این گروه توانایی حمایت هورمونی مناسب را جهت افزایش فعالیت آنزیم نداشته است.

مقایسه فعالیت ALP در دو گروه (شاهد بارداری طبیعی و شاهد بارداری کاذب) نشان داد که افزایش معنی‌داری در فعالیت ALP گروه بارداری نرمال در تمامی روزها وجود دارد. این افزایش فعالیت را می‌توان به وجود جنین (که خود دارای فعالیت آلكالین فسفاتازی است). برهم کنش جنین با سلولهای اپی‌تلیالی آندومتر که احتمالاً فاکتورهای مترشحه از جنین سبب افزایش فعالیت آنزیم به خصوص در بخش اپی‌تلیالی می‌شود و واکنش دسیدوایی نسبت داد که متعاقب فرآیند دسیدوایی شدن بیان آنزیم ALP افزایش می‌یابد [۲۲]. زیرا در نیمه دوم فاز لوتئال فیبروبلاستهای آندومتر تحت تأثیر پروژسترون به سلولهای دسیدوایی تبدیل می‌شوند که نیازهای تغذیه‌ای بلاستوسیست را در مراحل اولیه تکوین تأمین می‌نمایند. اما در صورت نبود بلاستوسیست از شدت واکنش دسیدوایی کاسته شده و یک واکنش شبیه به دسیدوا رخ می‌دهد (دسیدوما) [۲۸]. بنابراین به علت ناکافی بودن واکنش دسیدوایی در مقایسه با دسیدوا فعالیت آنزیم در گروه شاهد بارداری کاذب نسبت به گروه شاهد بارداری به روش طبیعی کاهش می‌یابد. در همین ارتباط پولار

می‌پذیرد و محل انتقال مواد از سطح لومینال به سمت داخل آندومتر یا برعکس از سلولهای اپی‌تلیالی آندومتر به درون مجرای رحم است و به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت آنزیم ALP طی بارداری به ویژه زمان لانه‌گزینی مؤید نقش این آنزیم در فرآیند لانه‌گزینی است و این آنزیم با هیدرولیز سوبستراهای حاوی گروه فسفات و انتقال گروه فسفات می‌تواند در تنظیم محتویات لومینال رحم مؤثر باشد و سبب تغذیه بلاستوسیست در حوالی زمان پیش از لانه‌گزینی شود. همچنین در فرآیند دسیدوایی شدن در سلولهای استرومایی آندومتر نیز می‌تواند مؤثر باشد [۷، ۸، ۱۳، ۲۱ و ۲۲]. بنابراین از مجموع این تغییرات می‌توان چنین استنباط کرد که با توجه به افزایش هورمونهای تخمدانی به علت وجود جسم زرد، میزان فعالیت آنزیم ALP روند افزایشی را طی ابتدای دوران بارداری نشان می‌دهد. این ارتباط مستقیم بین هورمونهای تخمدانی و ALP را می‌توان از زوایای مختلف مدنظر داشت:

الف) چون هورمونهای تخمدانی باعث القای افزایش سنتز پروتئینهای درون سلولی می‌شوند و آنزیم ALP نیز ساختار پروتئینی دارد، پس افزایش استروژن می‌تواند منجر به افزایش ساخت و در نتیجه افزایش فعالیت ALP شود [۲۳]. البته استروژن هم می‌تواند سبب افزایش mRNA مربوط به ALP شود و هم می‌تواند سبب افزایش مکانیسمهای دخیل در تبدیل پروآنزیم به آنزیم فعال شود. به عبارتی آنزیمهایی که از قبل درون سلول ساخته شده‌اند به فرم فعال خود تبدیل شوند [۲۲].

ب) همانگونه که تحقیقات نشان داده، استروژن به‌عنوان یک فاکتور تکثیری سبب افزایش چرخه سلولی و تقسیم سلولی می‌شود و افزایش چرخه سلولی مترادف با افزایش سنتز درون سلولی نیز هست. پس افزایش فعالیت آنزیم می‌تواند نتیجه این فعالیت باشد [۱۳ و ۲۴] و در ارتباط با همین موضوع سنگاپتاو هال (Sengupta & Hall) گزارش کردند فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز در ابتدای دوره بارداری افزایش می‌یابد، علت این افزایش یا مربوط به آثار استروژن است که باعث تکثیر سلولهای آندومتر می‌شود یا سلولهای

کاهش یافته که منجر به کاهش فعالیت آنزیم می‌شود [۳۰]. اما در روز ششم از مقایسه دو گروه مشخص شد که فعالیت آنزیم در گروه تحریک شده نسبت به گروه شاهد باردار به روش طبیعی افزایش داشت این امر می‌تواند به علت وجود تعداد زیادی جسم زرد شکل گرفته از قبل باشد و تداوم فعالیت این جسم زرد باعث افزایش مقدار پروژسترون در مقایسه با استروژن می‌شود. همچنین hCG تولید شده از تعداد بیشتر جنین در گروه تحریک شده به نوعی دیگر باعث افزایش سطح پروژسترون می‌شود و در تحقیقات قبلی دانشمندان ثابت شده که فعالیت آنزیم توسط پروژسترون افزایش می‌یابد، بنابراین در روز ششم در مقایسه با دیگر روزها سبب افزایش فعالیت آنزیم می‌شود [۷].

بنابراین از مقایسه گروههای تحریک شده با گروههای شاهد مربوط مشخص شد که تحریک تخمک‌گذاری در مجموع سبب کاهش فعالیت آنزیم آندومتر می‌شود و مکان اصلی تغییرات فعالیت آنزیم در بخش آپیکال اپی‌تلیال لومینال و غده‌ای آندومتر 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؛ بنابراین می‌توان تغییرات آنزیم ALP که پس از تحریک تخمک‌گذاری اتفاق می‌افتد را به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده اختلال در پذیرندگی رحم در نظر گرفت که خود می‌تواند به علت تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم رحم پس از تحریک تخمک‌گذاری باشد.

(Pollard) و همکارانش با ارزیابیهای بیوشیمیایی، فعالیت آنزیم ALP رحم موش را طی سیکل بارداری طبیعی و کاذب بررسی کردند و نشان دادند که این فعالیت آنزیم ALP طی بارداری اولیه افزایش می‌یابد و حداکثر فعالیت آنزیم در روز هفتم بوده و پس از آن کاهش پیدا می‌کند [۲۱]. نتایج ماروج (Murdoch) و همکارانش نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم ALP در موش باردار به روش طبیعی به مراتب بیشتر از موش باردار کاذب بود [۲۰].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد الگوی فعالیت آنزیم در گروه تحریک شده و باردار به روش طبیعی مشابه با گروه شاهد باردار طبیعی بود و در مقایسه این دو گروه در روزهای اول بارداری تفاوت معنی‌داری دیده نشد اما در زمان لانه‌گزینی (روزهای چهارم و پنجم) گروه تحریک تخمک‌گذاری شده فعالیت کمتری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. در توجیه این مطلب می‌توان به موارد زیر اشاره کرد که: به علت برهم خوردن تعادل هورمونهای پروژسترون و استروژن، فعالیت آنزیمی آندومتر در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده کاهش یافت. علت این کاهش را می‌توان به تغییر گلیکوکالیکس سطح سلولی یا ظهور زود هنگام یا دیر هنگام پینوپودها نسبت داد [۲۹ و ۳۰]. همچنین تغییر تعادل هورمونی می‌تواند باعث تغییر در سنتز (کاهش سنتز) یا مهار فعالیت آنزیم شود. از سوی دیگر، بعد از تحریک تخمک‌گذاری شواهدی وجود دارد که درصد آپوتوز یا مرگ سلولی افزایش می‌یابد. بنابراین احتمال دارد در سطوح آندومتر نیز به علت مرگ سلولی تعداد سلولها

References

1. **Murphy CR.** The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. Hum Reprod Update 1995; 1: 567-80.
2. **Murphy CR, Shaw TG.** Plasma membrane transformation a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period. Cell Biol Int 1994; 18: 1115-28.
3. **Lucas DK.** The role of endometrium in implantation. Hum Reprod 1997; 2(2): 170-5.
4. **Karen AL, Murphy CR.** Reorganization of the apical cytoskeleton of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat: a study with myosin subfragment J. Biol Cell 1992; 74: 195-202.
5. **Murphy CR.** Structure of the plasma membrane of uterine epithelial cells in blastocyst attachment: a review. Reprod Fertil Develop 1992; 4: 633-43.
6. **Francoise Y Png, Murphy CR.** Closure of the

- uterine lumen and the plasma membrane transformation do not require blasocyst implantation. *European J Morphol* 2000; 38(2): 122-27.
7. **Bugalia NS, Sharma RD.** Endometrial glycogen, protein, nucleic acids and phosphatases during oestrous cycle in buffaloes. *Br Vet J* 1990; 146: 362-9.
 8. **Buxton LE, Murdugh RN.** Behaviour and properties of membrane-bound mouse uterine alkaline phosphatase during early pregnancy. *Aust J Biol Sci* 1989; 33: 539-48.
 9. **Harris H.** The human alkaline phosphatase. *Clin Chim Acta* 1998; 186: 133-45.
 10. **Lindenbaum E, Beach D, Peretz BA.** Ultrastructural localization of alkaline and acid phosphatase in the human fallopian tube epithelium during the menstrual cycle. *Anat Rec* 1992; 203: 67-72.
 11. **Hui-Chin H, Gu-Gang C.** Differentiation of the low-binding mechanism for magnesium 10n activation and zinc 10n inhibition of human placental alkaline phosphatase. *Protein Sci* 2001; 10(1): 34-45.
 12. **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: 189-93.
 13. **Winklmann A, Spornitz UM.** Alkaline phosphatase distribution in rat endometrial epithelium during early pregnancy: A scanning electron-microscopic study. *Acta Anat* 1997; 158: 237-46.
 14. **Bansode FW, Chaulan SC, Makker a, Singh MM.** Uterine luminal epithelium alkaline phosphatase activity and pinopod development in relation to endometrial sensivity in the rat. *Contraception* 1998; 58: 61-68.
 15. **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.
 16. **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.
 17. **Pollard JW, Jahan M, Butteworth PJ.** Characterization and expression of uterine and placental alkaline phosphatases in the mouse. *J Reprod Fert* 1990; 89: 735-42.
 18. **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): 121-26.
 19. **Emadi SM, Salehnia M.** The comparision of mouse uterus alkaline phosphatase activity at the preimplantation time after ovarian hyperstimulation and progesterone injection. *Iran Anat sci* 2003 ; 1(3): 39-46.
 20. **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.
 21. **Tietz NW.** Textbook of clinical chemistry. W.B. Saunders. U.S.A. 1996; pp.704-17.
 22. **Sophie J, Mariann W.** Changes in the pattern of expression of alkaline phosphatase in the mouse uterus and placenta during gestation. *Anat Embryol* 1994; 190: 287-96.
 23. **Bucci M, Murphy CR.** Hormonal control of enzyme activity during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells. *Cell Biol Int* 2001; 25(9): 859-71.
 24. **Krajnicakova M, Lenhardt L, Valocky I, Cigankova V, Kostecy M, Maracek I.** Activity of alkaline and acidic phosphatase and non-specific esterase in the endometrium and oviduct of postpartum does. *Small Ruminant Res* 2004; 53:

- 47-51.
25. **Sengupta J, Talwar D, Paria BC, Ghosh D.** Endometrial phosphatases, β -glucuronidase and cathepsin D during menstrual cycle and pre-implantation stages of gestation in the rhesus monkey. *Acta Endocrinol* 1988; 118: 142-46.
26. **Dehghani H, Narisawa S, Millan JL, Hahnel AC.** Effects of disruption of the embryonic alkaline phosphatase gene on preimplantation development of the mouse. *Dev Dyn* 2000; 217(4): 440-8.
27. **Fazleabas AT, Hild-Petito S, Verhage HG.** The primate endometrium: morphological and secretory changes during early pregnancy. *Semin Reprod Enderinol* 1995; 13: 120-32.
28. **Madford AK, Najmabadi A, Paulson C.** Ultrastructural characteristics of the luteal phase endometrium in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Steril Fertil* 1997; 67(4): 1-7.
29. **Biegy M, Salehnia M, Al-Tiraihi T.** Delayed decidualization and ultrastructural changes of mouse endometrium after mouse ovarian hyperstimulation at the implantation time. *Middle East Fertility Society J* 2003; 8(3): 229-34
30. **Parr Er, Tung HN, Parr MB.** Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 1997; 36: 211-25.