ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز تخمدان موش طی ابتدای دوران بارداری طبیعی و کاذب تا زمان لانه‌گزینی

مریم نظم بجنوردی (M.Sc.)[1]، مژده صالح نیا (Ph.D.)[2]، عبدالامیر علامه (Ph.D.)[3].

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم اسید فسفاتاز یک آنزیم لیزوزومی است که در فعالیت‌های متابولیکی تخمدان مانند بلوغ تخمک، از سرگیری مجدد تقسیم میتوز، شکستن ژرمینال وزیکول و پدیده تخمک‌گذاری نقش دارد و همچنین با فعالیت اتوفاژی و هتروفاژی باعث هضم جسم زرد و فولیکول آترتیک می‌شود. با توجه به اینکه این آنزیم توسط هورمون استروئیدی کنترل می‌شود، این مطالعه برای بررسی الگوی تغییرات فعالیت این آنزیم در تخمدان موش پس از تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از تزریق گنادوتروپین‌های PMSG و hCG نسبت به گروه شاهد طی دوران ابتدای حاملگی طبیعی و کاذب طراحی گردید.

روش بررسی: موش‌های ماده نژاد NMRI با سن بین ۱۰-٦ هفته انتخاب و به‌طور تصادفی به دو گروه شاهد و تحریک شده (با به کارگیری PMSG و hCG) تقسیم شدند. سپس هر گروه نیز به دو گروه باردار به روش طبیعی و باردار کاذب تقسیم گردیدند. جهت القای بارداری کاذب از تحریک مکانیکی واژن استفاده شد. در هر گروه روزانه ٥ سر موش از روز اول تا ششم به طریق جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و به منظور ارزیابی‌های بیوشیمیایی، هر دو تخمدان آنها جدا و پس از هوموژن نمودن و سانتریفوژ کردن با دور g ۱٤۰۰۰ استخراج بافتی در معرض سوبسترای پارانیتروفنیل فسفات قرار گرفت و فعالیت آنزیم برحسب *IU/dl* محاسبه و پس از تعیین مقدار پروتئین نمونه‌ها برحسب واحد *mg/dl* ، فعالیت اختصاصی ACP برحسب واحد *IU/mg* محاسبه شد. داده‌های تحقیق حاضر با استفاده از آزمون Mann Whitheny مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. اختلاف آماری در سطح $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده و به صورت میانگین خطای استاندارد تعریف گردید. برای بررسی‌های هیستوشیمیایی، یکی از تخمدانها انتخاب و با استفاده از دستگاه کرایوستات، برش‌هایی به ضخامت μm ٥ تهیه شد. سپس برشها طبق روش گوموری، رنگ‌آمیزی شدند.

نتایج: فعالیت اختصاصی آنزیم ACP در نمونه‌های بافتی تخمدان در گروه‌های شاهد بارداری طبیعی، شاهد بارداری کاذب، تحریک بارداری طبیعی و تحریک بارداری کاذب در روز اول به ترتیب شامل ۰/۳٤±۰/۱۲ *IU/mg*، ۰/۳۹±۰/۰٤ *IU/mg*، ۰/٤۰±۰/۰۸ *IU/mg*، ۰/٤٥±۰/۰۱ *IU/mg* و در روز چهارم به ترتیب شامل ۰/٦۹±۰/۱۰ *IU/mg*، ۰/٦۱±۰/۰٦٥ *IU/mg*، ۱/۰۹±۰/۱۰ *IU/mg*، ۰/۷۹±۰/۰٥ *IU/mg* بود. تغییرات فعالیت آنزیم تخمدان در مطالعات بیوشیمیایی با نتایج به‌دست آمده در بررسی‌های هیستوشیمیایی در کلیه گروهها مطابقت داشت. یافته‌های حاصل نشان داد که بیشترین تغییرات فعالیت آنزیم در سلول‌های گرانولوزا بود به طوریکه در کلیه گروهها حداقل فعالیت آنزیم در روز اول حاملگی (۰) و حداکثر آن در روز چهارم (+۳) دیده شد.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در روزهای سوم و چهارم بارداری مؤید نقش این آنزیم در فرایندهای متابولیکی تخمدان و استروئیدسازی است و همچنین تحریک تخمک‌گذاری نمی‌تواند باعث تغییرات مشخصی در الگوی فعالیت آنزیم ACP تخمدان طی بارداری اولیه شود، هر چند که به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

کلید واژگان: اسید فسفاتاز، تحریک تخمک‌گذاری، تخمدان، لانه‌گزینی، بارداری کاذب، استروئیدسازی، بارداری.

مسئول مکاتبه: دکتر مژده صالح‌نیا، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۱۱- ۱٤۱۱٥ تهران، ایران.

پست الکترونیک: mogdeh@dr.com

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

تغییرات آنزیمی طی مراحل مختلف بارداری و به ویژه در زمان لانه‌گزینی، در ایجاد محیط بیوشیمیایی مناسب برای پذیرش جنین نقش مهمی دارند (۱،۲). یکی از مهمترین این آنزیمها، آنزیم اسید فسفاتاز است که در لیزوزوم اکثر سلولها یافت شده و دارای نقش فاگوسیتوزی است (۳). این آنزیم در هنگام تخمک‌گذاری سبب تخریب دیواره فولیکولی و غشا پایه شده و در بلوغ تخمک و لوتئولیز شدن آن نقش دارد (٦-٤). در واقع، آنزیم اسید فسفاتاز تخمدان می‌تواند در فعالیت‌های متابولیکی و بیوسنتزی جسم زرد طی فرآیند استروئید سازی و ادامه روند حاملگی مؤثر باشد. (۹-۷).

در زمینه تأثیر هورمون‌های جنسی بر فعالیت این آنزیم، Kleiman و همکاران تأثیر القای تخمک‌گذاری را بر میزان فعالیت ACP[1] مایع فولیکولی انسان بررسی نمودند و نتیجهٔ تحقیق آنها معرف افزایش مشخص سطح ACP مایع فولیکولی بود (۱۰). Banos و همکاران تأثیر تحریک تخمک‌گذاری را با استفاده از تزریق PMSG[2] بررسی کردند و آنها نشان دادند که فعالیت ACP سلول‌های تکا[3] و گرانولوزا، در گروه تحریک شده در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد (۱۱).

نتایج یک بررسی بیوشیمیایی نشان داد که فعالیت ACP در گروه تحریک شده در مقایسه با گروه کنترل در سطح بالاتری قرار دارد و میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های تکا به میزان ۱۰ برابر بیشتر از سلول‌های گرانولوزا است (۳). نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان داده است که تحریک تخمک‌گذاری باعث افزایش فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز تخمدان شده و می‌تواند باعث تغییرات متابولیکی تخمدان و نقایص بیوسنتزی تخمک و افزایش میزان مرگ و میر فولیکول‌های پره‌آنترال[4] شود که بر روند حاملگی نیز تأثیر منفی داشته و حتی منجر به شکست بارداری شود (۱۲،۱۳).

همچنین روش‌های تحریک تخمک‌گذاری با افزایش میزان (LH)[5]، بر عملکرد و دوام جسم زرد و به دنبال آن بر ادامه روند بارداری و لانه‌گزینی می‌تواند تأثیرگذار باشد (١٤).

از تحقیقات انجام شده، می‌توان نتیجه گرفت که تزریق هورمون‌های استروئیدی باعث تغییر در فعالیت ACP تخمدان شده و این تغییرات در مجموع بر بارداری و لانه‌گزینی تأثیرگذار خواهند بود (۱۷-۱۵).

بنابراین با توجه به اطلاعات مختصر در خصوص فعالیت ACP طی دوران حاملگی اولیه و همچنین تأثیر تحریک تخمک‌گذاری بر فعالیت این آنزیم در این تحقیق با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و هیستوشیمیایی تغییرات فعالیت آنزیم ACP طی دوران ابتدای بارداری موش‌های باردار طبیعی و باردار کاذب در دو گروه تحریک شده و تحریک نشده تا روز ششم بررسی شده و وضعیت روند فعالیت ACP تخمدان طی ابتدای حاملگی به عنوان یک مدل تا زمان لانه‌گزینی، تأثیر تحریک تخمک‌گذاری بر تغییر فعالیت آنزیم ACP تخمدان طی ابتدای بارداری در مقایسه با گروه شاهد و تفاوت بین فعالیت آنزیم ACP تخمدان در گروه‌های باردار نرمال و گروه‌های باردار کاذب مشخص گردید.

روش بررسی

در این تحقیق از موش‌های سوری ماده بالغ، نژاد NMRI (انستیتو رازی، ایران) با سن ۱۰-٦ هفته استفاده شد. موشها در شرایط دسترسی آزادانه به آب و غذا و اعمال دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته، درجه حرارت ^{o}C ۲٤-۱۸ نگهداری شدند. گروه‌های

1- Acid Phosphatase
2- Pregnant Mare Serum Gonadotropin
3- Theca cells
4- Preantral
5- Lutellizing hormone

Downloaded from http://www.jri.ir

مورد مطالعه شامل گروه شاهد با بارداری به روش طبیعی، گروه شاهد با بارداری کاذب، گروه تحریک شده و بارداری به روش طبیعی، گروه تحریک شده با بارداری کاذب بود.

به منظور تحریک تخمک‌گذاری ۱۰IU، PMSG به طریق داخل صفاقی و ٤٨ ساعت بعد به همان روش ۱۰IU hCG[1] 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 باردار کاذب توسط چرخاندن چندین بار یک سواپ در دهانه واژن انجام شد (۱۸).

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

در روش بیوشیمایی از ۱۲۰ سر موش ماده و در هر گروه روزانه ٥ سر موش فعالیت آنزیم از روز اول تا ششم بررسی شد. جانوران به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شده و هر دو تخمدان به عنوان نمونه انتخاب شدند. پس از تهیه نمونه و نگهداری آنها در ظرف یخ، نمونه‌ها توسط تیغ بیستوری تا حدامکان به قطعات ریز تقسیم شدند و به لوله آزمایش حاوی تقریباً دو برابر حجم نمونه بافر تریس (Merck, Germany) منتقل شد. هموژن کردن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه هموژنایزر مکانیکی (Polytron, Germany) به مدت یک دقیقه با RPM ۲۰۵۰۰ انجام شد و بعد نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ ^{o}C و با دور g ۱٤۰۰۰ سانتریفوژ شدند (سانتریفوژ یخچالدار مدل PK13IR, Germany). سپس سوپ روئی از محلول استخراج شده و جهت بررسی فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز با استفاده از کیت بیوشیمیایی (زیست شیمی، ایران) محاسبه شد. پروتئین کل با استفاده از کیت بیوشیمیایی پروتئین کل (شیم‌آنزیم، ایران) بررسی گردید و در نهایت فعالیت اختصاصی آنزیم براساس میزان فعالیت آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. داده‌های تحقیق حاضر با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون Mann Whitheny محاسبه و اختلاف آماری در سطح $p<۰/۰٥$ معنی دار در نظر گرفته شد و به صورت میانگین خطای استاندارد± میانگین تعریف گردید.

جهت بررسی‌های هیستوشیمیایی بعد از نمونه‌گیری به طور مشابه با روش بیوشیمیایی نمونه کوچکی از یکی از تخمدانها جدا شد. در شرایط برودت محفظه ۲۷^{o}C- برش‌هایی به ضخامت ٥μm تهیه شد. سپس برشها توسط استون (Merck, Germany) به مدت یک دقیقه تثبیت و در محلول سوبسترای پارانیتروفنیل فسفات واستات سرب (Merck, Germany) به مدت ٤٥ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و پس از رنگ‌آمیزی، لامها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده و عکس برداری انجام شد. مناطقی که فعالیت آنزیم وجود داشت به شکل قهوه‌ای دیده می‌شد. به منظور تعیین حداقل فعالیت آنزیم (واکنش صفر) برشی از بافت تخمدان مطابق مراحل فوق رنگ‌آمیزی گردید؛ با این تفاوت که نمونه‌ها به مدت یک ساعت قبل از رنگ‌آمیزی در شرایط دمایی ٦۰ ^{o}C انکوبه شدند تا آنزیم به وسلیه افزایش دما غیر فعال شود. همچنین جهت کنترل مثبت از برش‌های کبد استفاده شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی افتراقی از هماتوکسیلین استفاده شد. در ارزیابی میکروسکوپی نمونه‌ها، حداکثر واکنش آنزیم با امتیاز ٤+ و حداقل واکنش با امتیاز صفر مشخص گردید و واکنش‌های حدواسط به‌طور نسبی بین اعداد فوق در نظر گرفته شد.

1- Human Cohrionic Gonadotropin

Downloaded from http://www.jri.ir

نتایج

جدول ۱ نتایج حاصل از بررسی‌های بیوشیمیایی اسید فسفاتاز تخمدان را در گروه‌های تحریک تخمک‌گذاری و کنترل نشان می‌دهد. براساس این نتایج حداقل فعالیت اختصاصی آنزیم ACP در گروه شاهد باردار طبیعی در روز اول و حداکثر فعالیت اختصاصی آنزیم در روز چهارم بارداری دیده شد. فعالیت ACP در گروه شاهد باردار کاذب، از روز اول تا چهارم به استثنای روز دوم، دارای روند افزایش یابنده بوده و پس از آن کاهش یافته است. علاوه بر این آنالیز آماری فعالیت اختصاصی آنزیم در روزهای مختلف در گروه شاهد باردار کاذب و مقایسه آن با گروه شاهد باردار طبیعی، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری نشان نداد (جدول ۱).

در گروه تحریک شده و باردار به روش طبیعی، فعالیت اختصاصی آنزیم از روز اول تا سوم بارداری افزایش و پس از آن مجدداً کاهش یافته است (جدول ۱).

مقایسه فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه‌های تحریک شده و باردار به روش طبیعی با گروه شاهد باردار طبیعی نشان داد که فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه‌های تحریک شده، افزایش یافته و این افزایش در روزهای دوم، سوم، چهارم و ششم حاملگی معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$).

در گروه تحریک شده باردار کاذب نیز افزایش فعالیت اختصاصی آنزیم در روز چهارم بارداری مشهود بود.

مقایسه فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه‌های تحریک شده باردار کاذب با گروه شاهد باردار کاذب نشان دهنده وجود افزایش فعالیت آنزیم بود که این افزایش در روز چهارم، از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

مقایسه فعالیت اختصاصی آنزیم در گروه تحریک تخمک‌گذاری باردار به روش طبیعی با تحریک باردار کاذب، حاکی از وجود اختلاف معنی‌داری در روز سوم و ششم بارداری بود ($p<۰/۰۵$).

نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپ نوری، حاکی از آن بود که حضور آنزیم ACP تخمدانی در سلول‌های تکا و گرانولوزا قابل مشاهده بود. محل‌های واکنش فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز به شکل نقاط قهوه‌ای رنگ بود. شدت واکنش آنزیم در ۵ درجه یعنی از صفر تا ٤+ درجه‌بندی شد. فقدان فعالیت آنزیم با عدد صفر و حداکثر شدت واکنش آنزیم با عدد ٤ مشخص شد. جدول ۲، نشان می‌دهد که در گروه شاهد باردار کاذب طیف تغییرات آنزیم بین ۰ و ۳+ متغیر بوده است. به‌طوری که در روزهای اول و دوم شدت واکنش بین ۰ و ۱+، در روزهای سوم و پنجم بین ۱+ و ۲+، در روز چهارم بین ۲+ و ۳+ بوده و در روز ششم کل نمونه‌ها واکنش ۱+ داشتنه‌اند (شکل ۱).

در گروه شاهد باردار طبیعی حداقل واکنش آنزیم در سلول‌های گرانولوزا، در روز اول و دوم (۰) و حداکثر میزان فعالیت آنزیم در روز چهارم مشاهده شد (۳+).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار مقایسه روزانه فعالیت اختصاصی ACP (*IU/mg*) در نمونه‌های استخراج بافتی تخمدان در گروههای تحریک شده و تحریک نشده

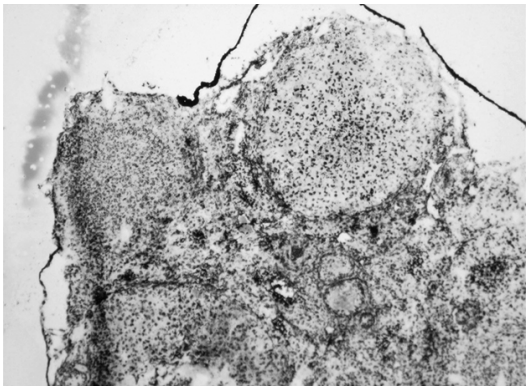
زمان بارداری (روز) / M±SD / گروهها	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
شاهد باردار طبیعی	۰/۳٤±۰/۱۲	۰/۳۹±۰/۰۵	۰/٦۱±۰/۰۵	۰/٦۹±۰/۱۰	۰/٤۸±۰/۰۵	۰/۵۰±۰/۰۹
شاهد باردار کاذب	۰/۳۹±۰/۰٤۸	۰/۳۵±۰/۰۹	۰/۵۳±۰/۰۷	۰/٦۱±۰/۰٦۵	۰/۵٤±۰/۰۹۸	۰/٤۸±۰/۰۵
تحریک شده باردار طبیعی	۰/٤۰±۰/۰۸	۰/٤۹±۰/۰۳[a]	۰/۹۰±۰/۱۷[a]	۱/۰۹±۰/۱۰[a]	۰/۵۰±۰/۰٦	۰/۷٤±۰/۰۹[a]
تحریک شده باردار کاذب	۰/٤۵±۰/۰۱	۰/٤۳±۰/۰۷	۰/۵۹±۰/۰٤[c]	۰/۷۹±۰/۰۵[b]	۰/٦۰±۰/۰۵۰	۰/۵۳±۰/۰۸[c]

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 (سطح معناداری درحد $p<۰/۰۵$ است).

Downloaded from http://www.jri.ir

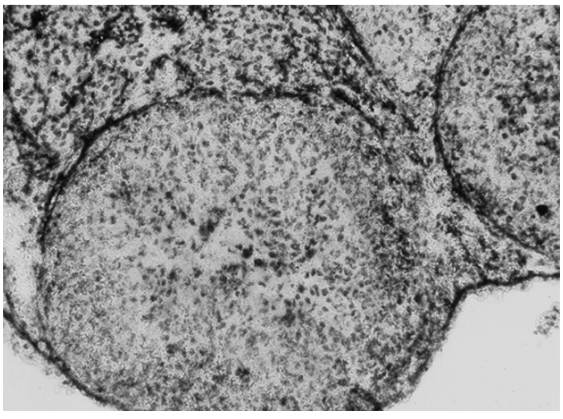


شکل۱- برش تخمدان موش گروه شاهد باردار کاذب در روز چهارم. پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی اسید فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط قهوه‌ای در سلول‌های گرانولوزا قابل مشاهده است. (بزرگنمایی× ۱۰۰)

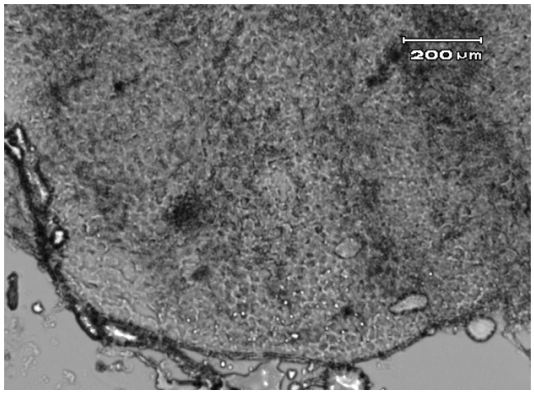
الگوی تغییرات شدت میزان فعالیت واکنش آنزیم در سایر روزها بین ۱+ و ۲+ بود (شکل ۲).

در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده باردار به روش طبیعی دامنه تغییرات شدت واکنش آنزیم در روز اول بین ۰ و ۱+ ، در روزهای سوم و ششم بین ۲+ و ۳+ و در روز چهارم بین ۳+ و ٤+ بود. همچنین در روزهای دوم و پنجم کل نمونه‌ها از شدت واکنش ۱+ برخوردار بودند. همانطور که مشخص است در روز چهارم حاملگی، ٦۰٪ نمونه‌ها واکنش ٤+ و ٤۰٪ بقیه واکنش ۳+ داشتند (جدول ۲ و شکل ۳).

در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده باردار کاذب، شدت واکنش آنیم در روز اول، در کلیه نمونه‌ها ۱+ بود اما در روز دوم کاهش یافته بود به طوری که ٤۰٪ نمونه‌ها



شکل۳- برش تخمدان موش، گروه تحریک باردار طبیعی در روز سوم. پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی اسید فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط قهوه‌ای در سلول‌های گرانولوزا قابل مشاهده است. (بزرگنمایی× ٤۰۰)

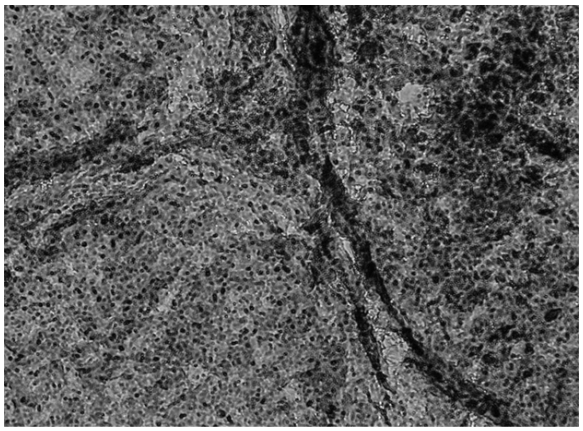


شکل۲- برش تخمدان موش گروه شاهد باردار طبیعی در روز چهارم. پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی اسید فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط قهوه‌ای در سلول‌های گرانولوزا قابل مشاهده است. (بزرگنمایی × ۱۰۰)

فاقد واکنش (۰) و ٦۰٪ دارای واکنش ۱+ بودند. فعالیت آنزیم در روزهای سوم و چهارم روند افزایشی داشت (روز سوم ۲+ و روز چهارم بین ۳+ و ٤+ دیده شد. در روز پنجم کل نمونه‌ها واکنش ۲+ و در روز ششم واکنش نمونه‌ها بین ۱+ و ۲+ متغیر بود (جدول ۲ و شکل ٤).

بحث

مقایسه روند فعالیت آنزیم، در دو گروه شاهد باردار به روش طبیعی و شاهد باردار کاذب، نشان داد که در این دو گروه الگوی فعالیت یکسان بوده و تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند. یافته‌های این تحقیق، افزایش فعالیت آنزیم را در هر دو گروه در روز سوم و چهارم بارداری (معادل



شکل٤- برش تخمدان موش، گروه تحریک باردار کاذب در روز چهارم. پس از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی اسید فسفاتاز فعالیت آنزیم به شکل نقاط قهوه‌ای در سلول‌های گرانولوزا قابل مشاهده است. (بزرگنمایی× ٤۰۰)

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۲- ارزیابی میزان فعالیت آنزیم ACP تخمدان، از روز اول تا ششم در گروههای تحریک شده و تحریک نشده

جایگاه فعالیت ACP- گروهها / روز بارداری	سلول گرانولوزا							
	حداقل واکنش (درصد) *				حداکثر واکنش (درصد)			
	شاهد		تحریک		شاهد		تحریک	
	طبیعی	کاذب	طبیعی	کاذب	طبیعی	کاذب	طبیعی	کاذب
اول	۰(۶۰)	۰(۸۰)	۰(۴۰)	+۱(۱۰۰)	+۱(۴۰)	+۱(۲۰)	+۱(۶۰)	-
دوم	۰(۴۰)	۰(۸۰)	+۱(۱۰۰)	۰(۴۰)	+۱(۶۰)	+۱(۲۰)	-	+۱(۶۰)
سوم	+۱(۲۰)	+۱(۶۰)	+۲(۴۰)	+۲(۱۰۰)	+۲(۸۰)	+۲(۴۰)	+۳(۶۰)	-
چهارم	+۲(۶۰)	+۲(۸۰)	+۳(۴۰)	+۳(۶۰)	+۳(۴۰)	+۳(۲۰)	+٤(۶۰)	+٤(۴۰)
پنجم	+۱(۸۰)	+۱(۶۰)	-	+۲(۱۰۰)	+۲(۲۰)	+۲(۴۰)	-	-
ششم	+۱(۶۰)	+۱(۱۰۰)	+۲(۴۰)	+۱(۴۰)	+۲(۴۰)	-	+۳(۶۰)	+۲(۶۰)

* درصد شدت واکنش در برشهای بافتی هر گروه در همان روز محاسبه شده است.

زمان لانه‌گزینی) تأیید کرد. با توجه به اینکه فعالیت سلول‌های تکا و گرانولوزا و عمل استروئیدسازی، از روز اول بارداری تا زمان لانه‌گزینی افزایش می‌یابد، لذا به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت آنزیم ACP بتواند در متابولیسم مواد طی فرایند استروئیدسازی، نقش داشته باشد (۱۸). علاوه بر این، اصولاً فعالیت آنزیم‌های تخمدان توسط عوامل مختلفی تحت کنترل است که از مهمترین آنها می‌توان به استروژن، پروژسترون، پروستاگلاندین E2 و cAMP اشاره کرد. در نتیجه، مقدار زیاد پروژسترون در زمان لانه‌گزینی، می‌تواند با افزایش فعالیت اسیدفسفاتاز مرتبط باشد.

از سوی دیگر با توجه به اینکه تغییرات pH لیزوزوم سلول‌های فولیکولی تخمدان به‌وسیله پمپ‌های پروتونی (H^+) کنترل می‌شود (۱۹)؛ لذا افزایش پروژسترون در زمان لانه‌گزینی، هم باعث افزایش تعداد و هم باعث افزایش فعالیت پمپ‌های پروتونی غشاء لیزوزومها شده و فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز را افزایش می‌دهد (۱۹).

در زمینه کنترل فعالیت اسید فسفاتاز تخمدان توسط هورمون‌های جنسی، Henderson و همکاران نیز اعلام کردند که فعالیت این آنزیم توسط هورمون‌های جنسی تنظیم می‌شود (۲۰).

Kleinman و همکاران با استفاده از بررسی‌های بیوشیمیایی مایع فولیکولی انسانی، مشخص کردند که افزایش فعالیت آنزیم ACP در بلوغ تخمک و همچنین پدیده تخمک‌گذاری نقش مهمی دارد بدین صورت که میزان فعالیت اسید فسفاتاز در مایع فولیکولار تخمدان‌هایی که تخمک‌گذاری در آنها انجام نشده بود، نسبت به گروه کنترل در سطح پایین‌تری قرار داشت (۱۰).

در سال ۱۹۸۹، Wang و همکاران مشاهده کردند که ACP در فعالیت‌های تخمدانی، مانند از سرگیری مجدد تقسیم میوز، شکستن وزیکول ژرمینال[1] (GV) و لوتئولیز شرکت دارد. در فولیکول‌های تخمدانی[2] در محیط کشت، لیزوزومها در اطراف وزیکول ژرمینال در فولیکول‌های تخمدانی تجمع می‌یابند که این افزایش تجمع در زمان افزایش LH، مشخص‌تر است. فعالیت لیزوزوم قبل از شکسته شدن وزیکول ژرمینال می‌تواند پاسخی به فاکتورهای محیطی در احیا مجدد میوز در تخمدان باشد. همچنین آنزیم‌های لیزوزومی با فعالیت اتوفاژی و هتروفاژی باعث هضم جسم زرد و فولیکول آترتیک می‌شوند. در زمان آترزی فولیکول تخمدان، افزایش ACP، باعث تخریب سلول‌های گرانولوزا می‌شود (۹).

مقایسه گروه‌های تحریک شده با گروه شاهد یعنی بین

1- Germinal vesicle
2- Ovarian follicle

Downloaded from http://www.jri.ir

گروه تحریک باردار به روش طبیعی با شاهد باردار به روش طبیعی و گروه تحریک باردار کاذب با شاهد باردار کاذب، نشان داد که افزایش فعالیت آنزیم در گروه تحریک شده باردار به روش طبیعی در مقایسه با گروه شاهد خود، در روزهای دوم تا ششم بارداری معنی‌دار بود اما در گروه تحریک حامله کاذب در مقایسه با گروه شاهدش، فقط در روز چهارم حاملگی معنی‌دار بود. در واقع به علت رشد همزمان تعداد زیادی فولیکول و افزایش تشکیل جسم زرد و عملکرد آن در گروه‌های تحریک تخمک‌گذاری شده، فعالیت آنزیم در مقایسه با گروه شاهد آنها در سطح بالاتری قرار دارد.

همچنین مقایسه روزانه فعالیت آنزیم بین گروه‌های تحریک شده باردار طبیعی و کاذب در اکثر روزها اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری نشان نداد. محققین دیگر با بررسی تأثیر هورمون‌های استروئیدی را بر فعالیت اسید فسفاتاز تخمدان انسان مشاهده کرده‌اند که میزان فعالیت آنزیم مایع فولیکولی در گروه تحریک شده افزایش می‌یابد (۲۱).

در همین رابطه Banos و همکاران نیز، اعلام کردند که تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از تزریق PMSG باعث افزایش فعالیت ACP تخمدان موش می‌شود (۱۱).

در سال ۲۰۰۱، Dhanju و همکاران تأثیر تحریک تخمک‌گذاری را بر میزان فعالیت ACP تخمدان موش با استفاده از تکنیک‌های بیوشیمیایی بررسی کردند. آنها دوزهای مختلف *IU*ه، ۷/۵ و ۱۰ PMSG را به کار گرفته و مشاهده کردند که در تمام این گروهها فعالیت ACP، وزن تخمدان و میزان تخمک‌گذاری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته و بیشترین افزایش در زمانی است که از *IU* ۷/۵ PMSG استفاده می‌شود (۲۲).

در سال ۲۰۰۳، Cheema و همکاران تأثیر تحریک تخمک‌گذاری را با استفاده از تزریق PMSG و hCG بر میزان فعالیت آنزیم‌های تخمدان موش به طریق بیوشیمیایی بررسی کردند. نتایج تحقیق نشان داد که میزان فعالیت ACP تخمدان، پس از القا تحریک تخمک‌گذاری، تفاوت چندانی در مقایسه با گروه کنترل نشان نمی‌دهد (٦).

لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر تأیید پلاک واژن معادل حاملگی در نظر گرفته شد که می‌توان در تحقیقات دیگر ارتباط تعداد جنینها و جفت‌های تشکیل شده را نیز با فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز بررسی کرد.

در مجموع تحقیقات نشان می دهند که تحریک تخمک‌گذاری باعث افزایش فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز تخمدان شده و می‌تواند باعث تغییرات متابولیکی تخمدان و نقایص بیوسنتزی تخمک شود (۲٤-۲۱).

نتیجه‌گیری

بنابراین روش تحریک تخمک‌گذاری که در مراکز درمانی IVF رایج است می‌تواند با ایجاد تغییرات هورمونی بر فعالیت آنزیمی تخمدان و عملکرد آن مؤثر بوده و تاثیرات نامطلوبی در روند حاملگی و به ویژه لانه‌گزینی داشته باشد. همچنین اگر تغییرات آنزیم‌های دیگر نیز طی حاملگی و پس از تحریک تخمک‌گذاری بررسی شود، می‌توان وقایع مولکولی و بیوشیمیایی تخمدان در زمان لانه‌گزینی را بهتر شناخت و راه‌حل‌هایی به منظور ارتقای کیفیت و شرایط لانه‌گزینی را پیشنهاد داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از کارشناسان محترم گروه علوم تشریح، جناب آقای بیرانوند و سرکار خانمها ابراهیمی و افشار نادری کارشناس گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر همکاری‌های ارزنده خود در فراهم نمودن تسهیلات لازم برای انجام این تحقیق ابراز می‌نمایند.

Downloaded from http://www.jri.ir

References

1- Brayman M., Thathiah A., Carson D. MUCI: A multi-functional cell surface component of reproductive tissue epithelial. Reprod Biol.2004;2: 4-8.

2- Aplin J.D. The cell biological basis of human implantation. Obstet Gynecol.2000;14:757-764.

3- Tsiligiann T.H., Karagiannidis A., Saratsis P., Brikas P. Enzyme activity in bovine cervical mucus during spontaneous and induced estrus. J Vet Res.2003;67:189-93.

4- Bull H., Murray P., Thomas D., Fraser A., Nelson P. Acid phosphatase. J Clin Pathol.2002;55:65-72.

5- Flood P.F., Tyler N.J.C., Read E.K., Rodway M.J., Chedrese P.J. Ovarian and placental production of progesterone and oestradiol during pregnancy in reindeer. Anim Reprod Sci.2005;85:147-162.

6- Cheema R., Dhanju C.K., Matharoo J.S. Response related enzymatic changes in ovaries of superovulated mice. Exp Biol.2003;41(2):171-173.

7- Imai K., Khandoker M., Yonai M., Takashashi T., Sato T., Ito A. Matrix metalloproteinases-2 and- 9 activities in bovine follicular fluid of differentsized follicles: relationship to intrafollicular inhi-bin and steroid concentrations. Domest Anim Endocrinol.2003;24:171-83.

8- Havelok J., Rainey W., Carr B. Ovarian granulosa cell lines. Mol Cell Endocrinol.2004;228:67-78.

9- Wang I., Fraser I. Lysosomes: An important mediator in the female reproductive tract. Obstet Gynecol.1989; 45(1):18-33.

10- Kleinman D., Insler V., Leiberman J., Glezerman M., Albotiano S., Potashnik G., et al. Acid phosphatase levels in follicular fluids following induction of ovulation in in vitro fertilization patients. J In Vitro Fert Embryo Transf.1987;4(3):181-4.

11- Banos M.E., Rosales A.M., Ballesteros L.M., Hrnandez O., Rosado A. Changes in lysosomal enzyme activities in pre-ovulatory follicles and endometrium of PMSG superovulated rats. Arch Med Res.1996;27(1): 49-55.

12- Tavanioton A., Albano A., Smitz J., Devroey P. Impact of ovarian stimulation on corpus luteum function and embryonic implantation. J Reprod Immunol.2002; 55:123-30.

13- Rosales T., Avalos R., Vergara O., Hernandez P., Ballesteros L., Garcia M. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicle: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. Mol Reprod Dev.2000;55 (3):270-81.

14- Beckman G., Beckman L., Lofstrand T. Acid and alkaline phosphatase in amniotic fluid in normal and complicated pregnancy. Act Obstet Gynecol.1978;57: 1-5.

15- Lindhard A., Ley U., Ravn V., Islin H., Hviid T., Rex .S, et al. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. Fertil Steril.2002;78 (2):221-233.

16- Wang I., Fraster I., Barsamian S., Monconi F., Street D., Cornillie F., et al. Endometrial lysosomal enzyme activity in ovulatory dysfunctional uterine bleeding, IUCD users and post-partum women. Mol Hum Reprod.2000;6 (3):258-263.

17- Krajni M., Lenhardt L., Valocky L., Cigankova V., Kostecky M., Maragek I. Activity of alkaline and acid phosphatase and non specific esterase in the endometrium and oviduct of post partum does. Elsevier, 2003.

18- Rosales T., Avalos R., Vergara O., Hernandez P., Ballesteros L., Garcia M. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicle: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. Mol Reprod Dev.2000;55(3): 270-81.

19- Bucci M., Murphy C.R. Hormonal control of enzyme activity during the plasma membrane transformation of uterus epithlial cells. Cell Biol. 2001;25(9):859-871.

20- Henderson K.A., Cupps P.T. Acid and alkaline phosphatase in bovine antral follicles. Nat Sci.1989;13: 1363-1369.

21- Ertzeid G., Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. Hum Reprod.2001;16(2):221-225.

22- Dhanju C.K., Sangha G.K., Sekhon P.K. Biochemical status of ovaries after induction of superovulation on different days of estrus cycle in mice. Ind J Exp Biol. 2001;39(8):777-80.

23- Lindhim S., Sauer M., Carmina E., Chang P., Zimmerman R., Rogerio A. Circulating levels during ovulation induction: relation to adiposity and ovarian morphology.Fertil Steril.2000;73(3):493-498.

24- Emadi M., Salehnia M. The morphological expression of endometrial pinopodes during implantation in mice after ovarian stimulation and pro-gesterone injection. Yakhteh.2004;5(20):140-145.

Downloaded from http://www.jri.ir