بررسی هیستوپاتولوژیک تأثیر ویتامین D بر تعداد ماست سل‌ها و الگوی دگرانوله شدن آنها در آندومتر رحم موش در زمان پیش از لانه‌گزینی

زهرا مسیبی[۱]، دکتر ماندانا بیگی بروجنی[۲]، دکتر مجید طوافی[۳]، دکتر نسیم بیگی بروجنی[۴*]

۱. کارشناس ارشد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۲. استاد گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۳. استاد گروه بافت‌شناسی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۴. استادیار کلینیکال پاتولوژی دامپزشکی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۰۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۵/۰۵/۰۶

خلاصه

مقدمه: اختلال در تنظیم ایمنی از علل کاهش پذیرندگی آندومتر و ناباروری است. ماست‌سل‌ها از سلول‌های ایمنی آندومتر هستند و فعال‌شدن بیش از حد آن‌ها با افزایش التهاب موضعی، لانه‌گزینی را مختل می‌کند. ویتامین D به‌عنوان یک تنظیم‌کننده ایمنی، احتمالاً از طریق تعدیل فعالیت ماست‌سل‌ها در حفظ هموستاز آندومتر نقش دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی هیستوپاتولوژیک تأثیر ویتامین D بر تعداد ماست سل‌ها و الگوی دگرانوله شدن آنها در آندومتر رحم موش در زمان پیش از لانه‌گزینی انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه تجربی، ۲۰ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI به دو گروه کنترل و آزمایش (دریافت‌کننده ویتامین D) تقسیم شدند. ۳/۵ روز پس از القای حاملگی کاذب در هر دو گروه، از یک سوم شاخ میانی رحم نمونه‌برداری و مقاطع بافتی تهیه شد. سپس با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، تعداد ماست‌سل‌ها و وضعیت دگرانولاسیون آن‌ها در سه الگوی گرانوله، نیمه‌گرانوله و دگرانوله ارزیابی و داده‌ها با استفاده از مدل معادلات برآورد تعمیم‌یافته و توزیع پواسون تحلیل شدند.

یافته‌ها: بر اساس بررسی‌های هیستوپاتولوژیک، ویتامین D موجب کاهش میانگین تعداد ماست‌سل‌های آندومتر رحم شد، اما این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود (p=۰/۵۰۸). نسبت نرخ بروز ماست‌سل‌های گرانوله در گروه ویتامین D نسبت به کنترل کاهش یافت که از نظر آماری معنادار نبود(p =۰/۴۵۵). در مقابل، نرخ بروز ماست‌سل‌های نیمه‌گرانوله افزایش را نشان داد؛ بااین‌حال، این تفاوت نیز از نظر آماری معنادار نبود (p=۰/۶۷۷). همچنین نسبت نرخ بروز ماست‌سل‌های دگرانوله برابر با ۰/۵۸ بود که حاکی از کاهش این نرخ بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنادار نبود (p=۰/۳۸۶).

نتیجه‌گیری: اگرچه ویتامین D تفاوت آماری معناداری در تعداد ماست‌سل‌ها ایجاد نکرد، احتمالاً با کاهش فعال‌شدن آن‌ها، موجب تعدیل التهاب آندومتر و ایجاد شرایطی مساعدتر برای فرایند لانه‌گزینی می‌شود. این اثر بیولوژیک می‌تواند در بهبود محیط آندومتر و کاهش ناباروری اهمیت داشته باشد؛ بااین‌حال، تأیید آن نیازمند مطالعاتی با حجم نمونه بیشتر است.

کلمات کلیدی: آندومتر، دگرانوله شدن سلولی، زمان پیش از لانه‌گزینی، ماست‌سل، ناباروری، ویتامین D

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر نسیم بیگی بروجنی؛ مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
تلفن: ۰۶۶-۳۳۲۰۴۰۰۵؛ **پست الکترونیک:** nasim_boroujeni@yahoo.com

مقدمه

ناباروری به‌عنوان یکی از چالش‌های چندبُعدی در طب تولیدمثل، ابعاد روانی، اجتماعی و زیستی گسترده‌ای دارد و سالانه میلیون‌ها زوج در سنین باروری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱، ۲). علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر در فناوری‌های کمک‌باروری، موفقیت در لانه‌گزینی همچنان یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در فرآیند بارداری به شمار می‌رود. بخش قابل‌توجهی از شکست‌های بالینی، ریشه در اختلالات ظریف مولکولی و سلولی طی پنجره زمانی لانه‌گزینی دارد؛ بازه‌ای حساس که در آن، آندومتر باید به آمادگی لازم برای پذیرش بلاستوسیست برسد (۳، ۴).

آندومتر رحم، فراتر از یک بافت مخاطی صرف، به‌عنوان بستری پویا و فعال از نظر ایمنی‌شناختی، نقش هماهنگ‌کننده‌ای در تعاملات میان‌سلولی، فرآیند دسیدوالیزاسیون و تهاجم تروفوبلاست ایفا می‌کند (۳، ۴). موفقیت در این فرآیند مستلزم ایجاد ریزمحیطی ایمنی‌شناختی و متعادل است؛ محیطی که در آن، پاسخ‌های التهابی ضروری برای نفوذ جنین به‌درستی تعدیل شوند و هم‌زمان، تحمل ایمنی لازم برای جلوگیری از پس‌زدن جنین برقرار باشد. هرگونه عدم تعادل در این شبکه ظریف سیتوکینی و سلولی می‌تواند به تغییر در نفوذپذیری عروقی، اختلال در بازآرایی ماتریکس خارج‌سلولی و در نهایت، شکست لانه‌گزینی یا بروز عوارض جفتی منجر شود (۵، ۶).

در این میان، ماست‌سل‌ها به‌عنوان یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی ذاتی در آندومتر، نقشی دوگانه و حیاتی بر عهده دارند. این سلول‌ها با برخورداری از ذخایر غنی از میانجی‌های زیست‌فعال، نظیر هیستامین، تریپتاز، کیماز و فاکتورهای رشد، در شرایط فیزیولوژیک، در تنظیم پاسخ‌های عروقی و فرآیند بازسازی بافتی نقش دارند (۷، ۸). بااین‌حال، ناهمگونی و انعطاف‌پذیری عملکردی این سلول‌ها به این معناست که در صورت فعال‌شدن پاتولوژیک یا دگرانولاسیون کنترل نشده، ممکن است با آزادسازی مداوم واسطه‌های پیش‌التهابی، ریزمحیط آندومتر را برای بقای جنین نامساعد سازند. بنابراین، ارزیابی وضعیت دگرانولاسیون این سلول‌ها در آستانه لانه‌گزینی، نه‌تنها یک شاخص هیستوپاتولوژیک، بلکه شاخصی بالقوه برای ارزیابی وضعیت ایمنی‌شناختی آندومتر در دوره پیش از لانه‌گزینی محسوب می‌شود (۱۳-۹).

در دهه اخیر، ویتامین D فراتر از نقش کلاسیک خود در متابولیسم کلسیم، به‌ویژه در حوزه ایمنی‌شناسی تولیدمثل، به‌عنوان عاملی مهم در تعدیل پاسخ‌های ایمنی شناخته شده است. بیان گیرنده اختصاصی ویتامین D (VDR)[1] در آندومتر، حاکی از نقش بالقوه این ویتامین در تنظیم بیان ژن‌ها در سلول‌های استرومایی و اپی‌تلیال رحم و تعدیل مسیرهای مرتبط با پذیرندگی آندومتر است (۱۴، ۱۵). فرضیه اصلی پژوهش حاضر این است که ویتامین D می‌تواند از طریق اتصال به VDR و تعدیل مسیرهای پیش‌التهابی، مانند فاکتور هسته‌ای کاپا بتا (NF-κB)[2] و پروتئین کیناز فعال‌شونده با میتوژن (MAPK)[3]، نه‌تنها بر تعداد ماست‌سل‌ها، بلکه بر وضعیت عملکردی آن‌ها در مرحله پیش از لانه‌گزینی نیز تأثیر بگذارد. این اثر احتمالی می‌تواند با تعدیل دگرانولاسیون ماست‌سل‌ها و محدودکردن پاسخ‌های التهابی موضعی، به حفظ هموستاز آندومتر و فراهم‌شدن شرایط مناسب برای فرایند لانه‌گزینی کمک کند (۱۸-۱۶).

با وجود شواهد موجود پیرامون اثرات سیستمیک ویتامین D، مکانیسم‌های دقیق اثرگذاری موضعی آن بر جمعیت ماست‌سل‌های آندومتر در مرحله حساس پیش از لانه‌گزینی همچنان به‌طور کامل مشخص نشده‌اند. بر همین اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی هیستوپاتولوژیک و ارزیابی کمّی و کیفی الگوی دگرانولاسیون ماست‌سل‌ها در مدل موشی طراحی شد. یافته‌های این پژوهش، افزون بر کمک به درک بهتر ویژگی‌های بافت‌شناختی و آسیب‌شناختی ریزمحیط آندومتر، می‌تواند زمینه‌ساز طرح فرضیه‌های جدید درباره مداخلات احتمالی مبتنی بر ویتامین D برای

[1] Vitamin D receptor
[2] Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
[3] Mitogen-activated protein kinase

بهبود باروری در موارد مرتبط با اختلالات ایمنی آندومتر باشد.

روش‌کار

این مطالعه تجربی در سال ۱۴۰۴ بر روی موش سوری ماده بالغ از نژاد NMRI، در دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شد. در این مطالعه، حجم نمونه بر اساس مطالعات مشابه پیشین و با استفاده از نرم‌افزار G*Power، با در نظر گرفتن سطح معناداری ۰/۰۵ و توان آماری ۸۰٪، محاسبه شد. با احتساب احتمال ریزش نمونه، در مجموع ۲۰ سر موش سوری ماده بالغ از نژاد NMRI، با سن ۸-۶ هفته و وزن ۳۰-۲۵ گرم، انتخاب شدند. حیوانات به‌طور مساوی در دو گروه (هر گروه شامل ۱۰ سر) قرار گرفتند.

شرایط نگهداری و گروه‌بندی حیوانات

حیوانات در شرایط استاندارد حیوان‌خانه، شامل دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۱۰±۵۰ درصد، چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲/۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد پلت مخصوص جوندگان، نگهداری شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل: جنس ماده، نژاد NMRI، سن ۸-۶ هفته، وزن ۳۰-۲۵ گرم، سلامت ظاهری کامل و چرخه جنسی منظم بود. معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل: کاهش وزن بیش از ۱۰٪، بروز علائم بیماری، اختلال در چرخه جنسی یا مرگ حیوان در طول مطالعه در نظر گرفته شد.

حیوانات به‌صورت تصادفی به دو گروه مساوی (هر گروه شامل ۱۰ سر) شامل گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده ویتامین D تقسیم شدند.

آماده‌سازی و تجویز ویتامین D

ویتامین D تهیه‌شده از شرکت Merck، در روغن زیتون خالص حل شد و محلول نهایی برای تجویز از طریق گاواژ آماده‌سازی گردید. تجویز روزانه ویتامین D با دوز ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، از طریق گاواژ معده و به‌مدت ۳ هفته انجام شد. حیوانات گروه کنترل نیز حجم معادل از حلال، یعنی روغن زیتون، را با همان روش دریافت کردند (۱۹).

القای حاملگی کاذب و نمونه‌برداری

برای القای حاملگی کاذب، از روش تحریک مکانیکی واژینال با استفاده از سواب پنبه‌ای استریل آغشته به محلول نمکی فیزیولوژیک استفاده شد. سواب به‌آرامی وارد واژن شد و با حرکات چرخشی ملایم، به‌مدت ۳۰-۲۰ ثانیه، تحریک مکانیکی اعمال گردید تا پاسخ‌های فیزیولوژیک مشابه جفت‌گیری ایجاد شود (۲۰).

بر اساس پروتکل‌های پیشین، به‌منظور هم‌فازسازی چرخه جنسی، پس از تحریک واژینال، وضعیت چرخه جنسی حیوانات بررسی شد. ۳/۵ روز پس از القای حاملگی کاذب، در مرحله پیش از لانه‌گزینی، حیوانات بیهوش شدند و سپس با استفاده از روش انسانی یوتانازی شدند (۲۲-۲۰).

نمونه‌های بافتی از یک‌سوم میانی شاخ‌های رحمی برداشت شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در فرمالین بافری ۱۰٪ تثبیت گردیدند. نمونه‌ها طی مراحل استاندارد بافت‌پردازی، شامل آب‌گیری در الکل‌های با غلظت صعودی، شفاف‌سازی در زایلن و آغشتگی با پارافین، پردازش شدند. سپس، نمونه‌ها در قالب‌های پارافینی قرار گرفتند. برش‌های سریالی با ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم تهیه و برای رنگ‌آمیزی، روی لام‌های آغشته به چسب آلبومین منتقل شدند.

رنگ‌آمیزی و ارزیابی هیستوپاتولوژیک

به‌منظور شناسایی ماست‌سل‌ها و ارزیابی وضعیت دگرانولاسیون آن‌ها، از رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو با غلظت ۰/۱٪ و pH=۲/۸ استفاده شد. ارزیابی‌های میکروسکوپی به‌صورت کور (بدون آگاهی ارزیابان از گروه آزمایشی حیوانات) توسط دو ارزیاب مستقل و آموزش‌دیده انجام شد تا احتمال سوگیری در تفسیر نتایج کاهش یابد.

برای شمارش ماست‌سل‌ها، از هر لام ۵ میدان دید در نواحی مختلف استرومای آندومتر، با انتخاب تصادفی میدان‌ها، بررسی شد. ارزیابی در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر انجام گرفت. به‌منظور شمارش سلول‌ها در واحد سطح، یک پروب مربعی با ابعاد ۸/۵×۸/۵ سانتی‌متر روی تصویر دیجیتال نمایش‌داده‌شده در مانیتور اعمال گردید (۲۰، ۲۳).

وضعیت دگرانولاسیون ماست‌سل‌ها بر اساس معیارهای مورفولوژیک زیر در سه گروه طبقه‌بندی شد:

۱- گرانوله: حضور یکنواخت و متراکم گرانول‌های بنفش - قرمز در سراسر سیتوپلاسم، مرز سلولی مشخص و نبودِ گرانول آزاد در فضای خارج‌سلولی.

۲- نیمه‌دگرانوله: کاهش نسبی تراکم گرانول‌ها، مشاهده واکوئل‌های سیتوپلاسمی، نامنظم‌شدن حاشیه سلولی و حضور تعداد محدودی گرانول آزاد در محیط اطراف سلول.

۳- کاملاً دگرانوله: کاهش شدید یا فقدان تقریباً کامل گرانول‌ها، روشن یا کم‌رنگ‌شدن سیتوپلاسم، تغییر شکل سلولی و حضور گسترده گرانول‌های آزاد در فضای بین‌سلولی.

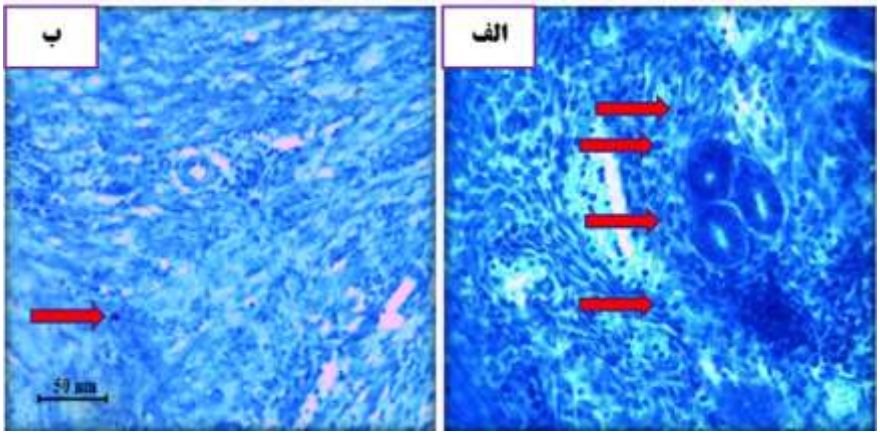
به‌منظور ارزیابی پایایی اندازه‌گیری‌ها، میزان توافق بین دو ارزیاب با استفاده از ضریب همبستگی درون‌رده‌ای (ICC)[1] سنجیده شد.

داده‌ها با استفاده از مدل معادلات برآورد تعمیم‌یافته (GEE)[2] تحلیل شدند و حیوان به‌عنوان واحد تحلیل آماری در نظر گرفته شد. در مدل، اثر اندازه‌گیری‌های تکراری مربوط به میدان‌های دید مختلف در هر حیوان لحاظ شد و ساختار همبستگی تبادلی (Exchangeable) برای داده‌ها انتخاب گردید. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Stata انجام شدند. نتایج به‌صورت نسبت نرخ بروز (IRR) همراه با فاصله اطمینان ۹۵٪ گزارش شدند. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های هیستوپاتولوژیک و آنالیز مقایسه‌ای تراکم ماست‌سل‌های آندومتر

بررسی مقاطع بافتی رحم با استفاده از رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، امکان شناسایی ماست‌سل‌ها را در آندومتر فراهم کرد. بررسی الگوی توزیع ماست‌سل‌ها در مقاطع بافتی، ناهمگونی قابل‌توجهی را در تراکم سلولی نشان داد؛ به‌طوری‌که نواحی دارای تراکم بالا (شکل ۱- الف) و تراکم پایین (شکل ۱- ب) در بخش‌های مختلف استرومای آندومتر مشاهده شدند.



شکل ۱- الف: ناحیه آندومتر رحم با تراکم بالای ماست‌سل؛ ب: ناحیه آندومتر با تراکم کم ماست‌سل

(بزرگ‌نمایی X۴۰۰) ماست سل با فلش ➡ مشخص شده است.

[1] Intraclass Correlation Coefficient
[2] Generalized Estimating Equations

به‌منظور کنترل همبستگی درون‌فردی ناشی از اندازه‌گیری‌های مکرر در هر حیوان، ساختار ماتریس همبستگی از نوع تبادل‌پذیر[1] در نظر گرفته شد. همچنین، برای کنترل اثر بیش‌پراکندگی احتمالی در داده‌های شمارشی، از خطاهای استاندارد مقاوم[2] استفاده گردید. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۱، تجویز ویتامین D با کاهش میانگین تعداد ماست‌سل‌های آندومتر رحم در مقایسه با گروه کنترل همراه بود. بااین‌حال، نسبت نرخ بروز در گروه دریافت‌کننده ویتامین D برابر با ۰/۸۷ بود و ازآنجایی که فاصله اطمینان ٪۹۵ آن (۱/۳۱-۰/۵۸) شامل عدد ۱ بود، این کاهش از نظر آماری معنادار نبود (p=۰/۵۰۸).

جدول ۱- نتایج آزمون GEE با خانواده پوآسون برای تعیین نسبت نرخ بروز میانگین تعداد ماست‌سل در دو گروه کنترل و آزمایش

گروه	نسبت نرخ بروز تعداد (IRR)	دامنه اطمینان ٪۹۵ (95% CI)	سطح معنی‌داری
گروه مرجع: کنترل			
ویتامین D	۰/۸۷	۱/۳۱-۰/۵۸	p=۰/۵۰۸

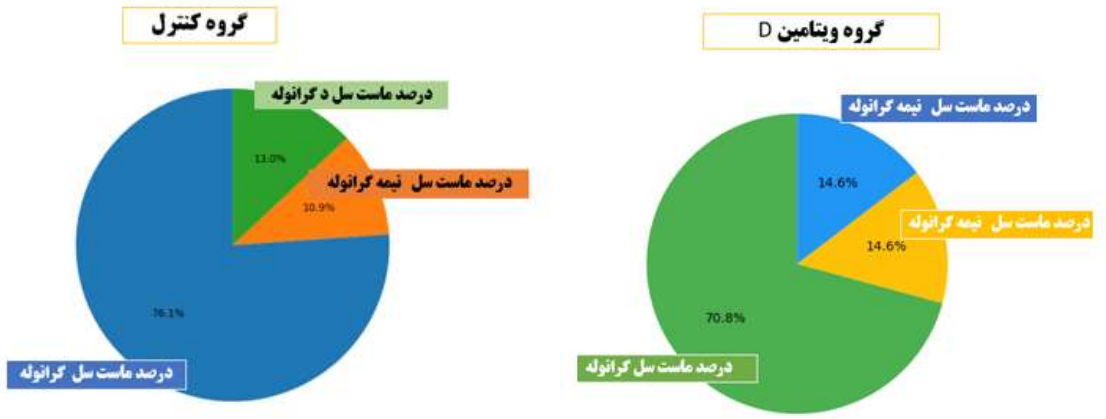
همچنین در بررسی الگوی دگرانولاسیون ماست‌سل‌ها در دو گروه بر اساس جدول ۲، تجویز ویتامین D با تغییراتی در نسبت نرخ بروز ماست‌سل‌ها در مراحل مختلف دگرانولاسیون همراه بود؛ بااین‌حال، هیچ‌یک از این تغییرات از نظر آماری معنادار نبودند. تجویز ویتامین D با کاهش نسبت نرخ بروز ماست‌سل‌های دگرانوله در مقایسه با گروه کنترل همراه بود (IRR=۰/۵۸، CI=۰/۱۷-۱/۹۷، ٪۹۵؛ p=۰/۳۸۶). این روند کاهشی در ماست‌سل‌های گرانوله نیز مشاهده شد (IRR=۰/۸۴، CI=۰/۵۴-۱/۳۲، ٪۹۵؛ p=۰/۴۵۵). در مقابل، نسبت نرخ بروز ماست‌سل‌های نیمه‌گرانوله افزایش نشان داد؛ بااین‌حال، این تغییر نیز از نظر آماری معنادار نبود (IRR=۱/۲۶، CI=۰/۴۳-۳/۶۸، ٪۹۵؛ p=۰/۶۷۷).

جدول ۲- نتایج آزمون GEE با خانواده پوآسون برای مقایسه تعیین نسبت نرخ بروز الگوی دگرانوله شدن ماست‌سل‌ها (گرانوله، نیمه‌گرانوله و دگرانوله) در دو گروه کنترل و آزمایش

گروه	نسبت نرخ بروز تعداد (IRR)	دامنه اطمینان ٪۹۵ (95% CI)	سطح معنی‌داری	الگوی دگرانولیشن ماست‌سل
گروه مرجع: کنترل				
ویتامین D	۰/۸۴	۱/۳۲-۰/۵۴	۰/۴۵۵	گرانوله
ویتامین D	۱/۲۶	۳/۶۸-۰/۴۳	۰/۶۷۷	نیمه‌گرانوله
ویتامین D	۰/۵۸	۱/۹۷-۰/۱۷	۰/۳۸۶	دگرانوله

همچنین، شکل ۱ توزیع درون‌گروهی انواع ماست‌سل‌ها را نشان می‌دهد. در گروه کنترل، اگرچه بخش عمده جمعیت سلولی را ماست‌سل‌های گرانوله (٪۷۶) تشکیل می‌دادند، سهم ماست‌سل‌های دگرانوله (٪۱۳) بیشتر از ماست‌سل‌های نیمه‌گرانوله (٪۱۰/۹) بود. در مقابل، در گروه دریافت‌کننده ویتامین D، با وجود حفظ سهم عمده ماست‌سل‌های گرانوله (٪۷۰/۸)، سهم ماست‌سل‌های دگرانوله و نیمه‌گرانوله برابر و معادل ٪۱۴/۶ بود. این الگوی توزیع می‌تواند مطرح‌کننده احتمال تأثیر ویتامین D بر وضعیت دگرانولاسیون ماست‌سل‌ها در آندومتر باشد؛ بااین‌حال، با توجه به نبود تفاوت‌های آماری معنادار در مقایسه بین گروه‌ها، نمی‌توان این یافته‌ها را به‌عنوان شواهد قطعی از نقش ویتامین D در مهار دگرانولاسیون کنترل‌نشده یا تعدیل پاسخ‌های التهابی بافت آندومتر تفسیر کرد.

[1] Exchangeable
[2] Robust Standard Errors



نمودار ۱- درصد توزیع درون‌گروهی الگوی انواع ماست‌سل‌ها در دو گروه کنترل و گروه ویتامین D

بحث

در پژوهش حاضر، اثر احتمالی تعدیل‌کنندگی ویتامین D بر جمعیت و الگوی دگرانولاسیون ماست‌سل‌های آندومتر در مدل موشی نژاد NMRI، در مرحله پیش از لانه‌گزینی بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده روند کاهشی در تعداد کل ماست‌سل‌ها و به‌ویژه ماست‌سل‌های کاملاً دگرانوله در گروه دریافت‌کننده ویتامین D بود؛ اگرچه این تغییرات، احتمالاً به‌دلیل محدودیت حجم نمونه و گستردگی فواصل اطمینان، به سطح معناداری آماری نرسیدند ($p>0/05$)، بااین‌حال، روندهای مشاهده‌شده از نظر زیستی قابل‌توجه‌اند و باید با احتیاط تفسیر شوند.

یافته‌های مطالعه حاضر تا حدودی با نتایج برخی پژوهش‌های پیشین همسو هستند که ویتامین D را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ای برای پاسخ‌های ایمنی در ریزمحیط‌های التهابی معرفی کرده‌اند. کونتی و همکار (۲۰۱۶) نشان دادند که ویتامین D می‌تواند فعالیت ماست‌سل‌ها را در شرایط التهابی تعدیل کند و آزادسازی میانجی‌های پیش‌التهابی، مانند هیستامین و پروتئازها را کاهش دهد (۲۴). همچنین، لامپیاسی و همکاران (۲۰۲۲)، در بررسی تعاملات ماست‌سل‌ها و ماکروفاژها در دستگاه تولیدمثل زنان، بر نقش دوگانه این سلول‌ها و اهمیت تنظیم دقیق فعالیت آن‌ها تأکید کرده است (۸). مطالعات مرتبط با اندومتریوز نیز نشان داده‌اند که استروژن می‌تواند در تنظیم پاسخ‌های التهابی مرتبط با ماست‌سل‌ها نقش داشته باشد و ویتامین D به‌عنوان عاملی بالقوه برای تعدیل این فرآیند مطرح شده است (۲۵). در مقابل، برخی پژوهش‌ها تفاوت معناداری در تراکم ماست‌سل‌ها یا الگوی دگرانولاسیون آن‌ها گزارش نکرده‌اند که این موضوع با نبودِ تفاوت‌های آماری معنادار در مطالعه حاضر همخوانی دارد. ناهمگونی نتایج مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در دوز مصرفی، مدت مداخله، نژاد حیوانات، روش ارزیابی یا وضعیت اولیه ویتامین D باشد. این موضوع، بررسی فرضیه تعدیل فعالیت ماست‌سل‌ها، به‌جای سرکوب کامل آن‌ها، را توجیه می‌کند؛ به این معنا که ویتامین D ممکن است پاسخ‌های این سلول‌ها را به سمت تعادل تنظیم کند، نه اینکه فعالیت آن‌ها را به‌طور کامل مهار سازد.

ماست‌سل‌ها در بازه زمانی حساس پیش از لانه‌گزینی، نقشی دوگانه ایفا می‌کنند؛ از یک‌سو، برای بازآرایی بافتی، تنظیم نفوذپذیری عروقی و برقراری ارتباط مناسب میان سلول‌های ایمنی و سلول‌های آندومتر ضروری هستند و از سوی دیگر، فعال‌شدن بیش از حد آن‌ها و آزادسازی مداوم واسطه‌هایی نظیر تریپتاز، کیماز و هیستامین می‌تواند تعادل ایمنی آندومتر را برهم بزند و محیطی پیش‌التهابی ایجاد کند (۱۳، ۲۲، ۲۳). روند کاهشی، هرچند از نظر آماری معنادار نبود، در تعداد ماست‌سل‌های کاملاً دگرانوله در مطالعه حاضر، این فرضیه را مطرح می‌کند که ویتامین D ممکن است از طریق اتصال به گیرنده ویتامین D

(VDR) و تشکیل کمپلکس با گیرنده رتینوئید X (RXR)[1]، بیان ژن‌های مرتبط با التهاب و تمایز سلولی را تنظیم کند.

این کمپلکس ممکن است فعالیت مسیرهای پیش‌التهابی، از جمله NF-κB و MAPK را تعدیل کند؛ مسیرهایی که در بقاء، مهاجرت، فعال‌سازی و دگرانولاسیون ماست‌سل‌ها نقش دارند (۱۲، ۲۴، ۲۶). بااین‌حال، باید تأکید کرد که در مطالعه حاضر، شاخص‌هایی مانند سطح سیتوکین‌ها، میزان آزادسازی تریپتاز و کیماز، بیان گیرنده VDR یا شاخص‌های مستقیم پذیرندگی آندومتر اندازه‌گیری نشدند. بنابراین، هرگونه استنباط درباره کاهش التهاب موضعی، بهبود ریزمحیط آندومتر یا افزایش پذیرندگی رحم، صرفاً در حد مکانیسم‌های احتمالی و فرضیه‌هایی برای بررسی در مطالعات آینده مطرح است و نباید به‌عنوان نتیجه مستقیم این پژوهش تلقی شود.

از دیدگاه ناباروری، اختلالات ایمنی آندومتر می‌توانند یکی از عوامل مؤثر در کاهش پذیرندگی رحم، شکست مکرر لانه‌گزینی و ناباروری با علت نامشخص باشند. در شرایطی که ماست‌سل‌ها بیش از حد فعال می‌شوند، آزادسازی مداوم پروتئازها و میانجی‌های التهابی می‌تواند ساختار ماتریکس خارج‌سلولی، نفوذپذیری عروقی و تعامل میان سلول‌های ایمنی و سلول‌های آندومتر را تغییر دهد (۸، ۲۴، ۲۷). کاهش نسبی تعداد ماست‌سل‌های دگرانوله در گروه دریافت‌کننده ویتامین D ممکن است از نظر زیستی، بیانگر گرایشی احتمالی به کاهش فعال‌سازی نابجای این سلول‌ها باشد؛ هرچند این مشاهده به‌تنهایی برای اثبات بهبود محیط آندومتر کافی نیست.

از برجسته‌ترین نقاط قوت پژوهش حاضر می‌توان به بررسی تأثیر تجویز ویتامین D بر ماست‌سل‌های آندومتر رحم در بازه زمانی پیش از لانه‌گزینی اشاره کرد؛ مرحله‌ای حساس که وضعیت آندومتر در موفقیت لانه‌گزینی اهمیت بسزایی دارد و در مطالعات پیشین کمتر مورد توجه قرار گرفته است. افزون بر این، ارزیابی هیستوپاتولوژیک نمونه‌ها در سطح میکروسکوپی و تفکیک الگوهای مختلف دگرانولاسیون ماست‌سل‌های آندومتر (گرانوله، نیمه‌دگرانوله و کاملاً دگرانوله)، همراه با مقایسه توزیع این الگوها در دو گروه، از دیگر نقاط قوت روش‌شناختی این مطالعه به‌شمار می‌رود. این رویکرد امکان بررسی دقیق‌تر تغییرات مورفولوژیک ماست‌سل‌ها را فراهم می‌کند؛ موضوعی که در مطالعات پیشین کمتر به‌صورت جامع بررسی شده است.

بااین‌حال، مطالعه حاضر با محدودیت‌هایی نیز همراه بود. مهم‌ترین محدودیت، حجم نمونه نسبتاً کوچک (۱۰ حیوان در هر گروه) است که می‌تواند توان آماری مطالعه را برای شناسایی اثرات متوسط یا کوچک کاهش دهد و به گستردگی فواصل اطمینان منجر شود. افزون بر این، رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، اگرچه روشی پذیرفته شده برای شناسایی و ارزیابی مورفولوژیک ماست‌سل‌هاست، عمدتاً اطلاعات ساختاری فراهم می‌کند و امکان اندازه‌گیری مستقیم میزان آزادسازی میانجی‌های شیمیایی را نمی‌دهد. اندازه‌گیری نشدن سطح سرمی ویتامین D پیش و پس از مداخله، فقدان ارزیابی‌های مولکولی، از جمله بررسی بیان گیرنده ویتامین D (VDR) و سنجش سیتوکین‌ها، و محدودیت تعمیم نتایج حاصل از مدل موشی به انسان نیز از دیگر محدودیت‌های این پژوهش هستند. بنابراین، یافته‌های حاضر نباید به‌عنوان اثبات قطعی اثر درمانی ویتامین D بر التهاب یا پذیرندگی آندومتر تفسیر شوند، بلکه باید آن‌ها را روندهایی احتمالی و از نظر زیستی قابل‌توجه در نظر گرفت که تأیید آن‌ها مستلزم انجام مطالعات آینده با حجم نمونه بیشتر، سنجش مستقیم میانجی‌های مشتق از ماست‌سل‌ها و بررسی شاخص‌های عملکردی و مولکولی است.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ویتامین D ممکن است از ظرفیت بالقوه‌ای برای تعدیل وضعیت فعال‌سازی ماست‌سل‌های آندومتر برخوردار باشد؛ هرچند یافته‌های حاضر برای تأیید این اثر کافی نیستند. این نتایج می‌توانند زمینه‌ساز شکل‌گیری مسیرهای تحقیقاتی جدید درباره نقش ویتامین D به‌عنوان تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی در سلامت تولیدمثل باشند. برای بررسی دقیق‌تر این فرضیه، انجام

[1] Retinoid X receptor

مطالعات آینده با تأکید بر سنجش مستقیم سیتوکین‌ها و پروتئازهای مشتق از ماست‌سل‌ها، ارزیابی بیان گیرنده ویتامین D (VDR) در بافت آندومتر و بررسی شاخص‌های عملکردی و بالینی باروری ضروری است. در نهایت، این مطالعه بر ضرورت بررسی بیشتر نقش احتمالی ویتامین D به‌عنوان یک عامل تعدیل‌کننده ایمنی تأکید می‌کند و انجام پژوهش‌هایی با طراحی روش‌شناختی قوی‌تر را برای ارزیابی ظرفیت آن در بهبود اختلالات مرتبط با پذیرندگی آندومتر ضروری می‌سازد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، تجویز ویتامین D گرایشی بالقوه به تعدیل فعال‌سازی و کاهش دگرانولاسیون ماست‌سل‌های آندومتر در بازه پیش از لانه‌گزینی نشان داد که علی‌رغم عدم معناداری آماری، از نظر بیولوژیکی در تنظیم تعادل ایمنی آندومتر حائز اهمیت است. تایید نهایی این نقش تعدیل‌کننده ایمنی نیازمند مطالعات مولکولی و ارزیابی مستقیم سایتوکاین‌های التهابی در آینده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم زهرا مسیبی در رشته علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی لرستان است که به تصویب رسیده است. بدین‌وسیله از مسئولان و کارکنان محترم دانشگاه علوم پزشکی لرستان به‌دلیل همکاری و حمایت‌های فنی در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در ارتباط با انجام، نتایج و انتشار این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافع مالی یا غیرمالی ندارند.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، تمام مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با اصول اخلاقی و دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. مطالعه پس از اخذ تأییدیه از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان با کدIR.LUMS.REC.1404.144 اجرا گردید.

حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی لرستان و در قالب طرح پژوهشی با کد -1397-1-99 4332 انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی، اجرا، جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل نتایج و نگارش نهایی مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی مقاله را تأیید کرده‌اند.

منابع

1. Romanis EC, Begović D, Brazier MR, Mullock AK. Reviewing the womb. Journal of medical ethics 2021; 47(12):820-9.
2. King AE, Critchley HO. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 2010; 120(2-3):116-26.
3. Gad A, Besenfelder U, Rings F, Ghanem N, Salilew-Wondim D, Hossain MM, et al. Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: implications for animal breeding and human assisted reproduction. Human Reproduction 2011; 26(7):1693-707.
4. Yang M, Liu S, Zhang C. The related metabolic diseases and treatments of obesity. InHealthcare 2022; 10(9):1616.
5. Harvey EB. Mast cell distribution in the uterus of cycling and pregnant hamsters. The Anatomical Record 1964; 148(3):507-16.
6. Yang X, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Ovarian and endometrial immunity during the ovarian cycle. Journal of reproductive immunology 2019; 133:7-14.

7. Di Renzo L, De Lorenzo A, Fontanari M, Gualtieri P, Monsignore D, Schifano G, et al. Immunonutrients involved in the regulation of the inflammatory and oxidative processes: implication for gamete competence. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2022; 39(4):817-46.
8. Lampiasi N. Interactions between macrophages and mast cells in the female reproductive system. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(10):5414.
9. Cermisoni GC, Alteri A, Corti L, Rabellotti E, Papaleo E, Viganò P, et al. Vitamin D and endometrium: a systematic review of a neglected area of research. International journal of molecular sciences 2018; 19(8):2320.
10. Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The effect of regular exercise on insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetes & metabolism journal 2016; 40(4):253.
11. Meixiong J, Dong X. Mas-related G protein–coupled receptors and the biology of itch sensation. Annual review of genetics 2017; 51:103-21.
12. McCallion A, Nasirzadeh Y, Lingegowda H, Miller JE, Khalaj K, Ahn S, et al. Estrogen mediates inflammatory role of mast cells in endometriosis pathophysiology. Frontiers in immunology 2022; 13:961599.
13. Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health. International journal of molecular sciences 2020; 21(11):4092.
14. Tamura I, Miyamoto K, Hatanaka C, Shiroshita A, Fujimura T, Shirafuta Y, et al. Nuclear actin assembly is an integral part of decidualization in human endometrial stromal cells. Communications Biology 2024; 7(1):830.
15. Gebril M, Mulder S, Das R, Nallasamy S. Extracellular matrix reorganization during endometrial decidualization. Histochemistry and Cell Biology 2025; 163(1):84.
16. Bergada L, Pallares J, Arcidiacono MV, Cardus A, Santacana M, Valls J, et al. Role of local bioactivation of vitamin D by CYP27A1 and CYP2R1 in the control of cell growth in normal endometrium and endometrial carcinoma. Laboratory investigation 2014; 94(6):608-22.
17. Soto JR, Anthias C, Madrigal A, Snowden JA. Insights into the role of vitamin D as a biomarker in stem cell transplantation. Frontiers in immunology 2020; 11:966.
18. Farhangnia P, Noormohammadi M, Delbandi AA. Vitamin D and reproductive disorders: a comprehensive review with a focus on endometriosis. Reproductive health 2024; 21(1):61.
19. Doncheva N, Mihaylova A, Zlatanova H, Ivanovska M, Delev D, Kostadinov I. Immunomodulatory properties of cholecalciferol in rats with experimentally induced inflammation. Pharmacia 2024; 71:1-9.
20. Zadi N, Beigi Boroujeni N, Tavafi M, Nazari L, Beigi Boroujeni M. Progesterone administration after ovarian stimulation: effects on ovary mast cell count and histamine level. Arch Adv Biosci 2023; 13(2).
21. Azadi N, Boroujeni NB, Hormozi M, Narimani L, Tavafi M, Anbari K, et al. Effect of progesterone administration on tissue mast cell population and histamine content in mice uterus after ovulation induction. JBRA Assisted Reproduction 2023; 27(3):436.
22. Narimani L, Boroujeni NB, Gholami M, Anbari K, Alavi SE, Ahmadi SA, et al. Pre-implantation effects of progesterone administration on ovarian angiogenesis after ovarian stimulation: a histological, hormonal, and molecular analysis. JBRA assisted reproduction 2020; 24(3):289.
23. Boroujeni MB, Boroujeni NB, Gholami M. The effect of progesterone treatment after ovarian induction on endometrial VEGF gene expression and its receptors in mice at pre-implantation time. Iranian journal of basic medical sciences 2016; 19(3):252.
24. Conti P, Kempuraj D. Impact of vitamin D on mast cell activity, immunity and inflammation. J Food Nutr Res 2016; 4:33-9.
25. McCallion A, Nasirzadeh Y, Lingegowda H, Miller JE, Khalaj K, Ahn S, et al. Estrogen mediates inflammatory role of mast cells in endometriosis pathophysiology. Frontiers in immunology 2022; 13:961599.
26. Johnson-Weaver B, Choi HW, Abraham SN, Staats HF. Mast cell activators as novel immune regulators. Current opinion in pharmacology 2018; 41:89-95.
27. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. Journal of lipid research 2014; 55(1):13-31.

Histopathological Evaluation of the Effect of Vitamin D on Mast Cell Count and their Degranulation Pattern in the Mouse Uterine Endometrium at Pre-Implantation Time

Zahra Mosayebi[1], Mandana Beigi Boroujeni[2], Majid Tavafi[3], Nasim Beigi Boroujeni[4*]

1. M.Sc. of Anatomical Sciences, Razi Herbal Medicines Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.
2. Professor, Department of Anatomical Sciences, Razi Herbal Medicines Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.
3. Professor, Department of Histology, Razi Herbal Medicines Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine of Clinical Pathology, Razi Herbal Medicines Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

Received: Apr 23, 2026 **Accepted:** Jul 28, 2026

Abstract

Introduction: Immune dysregulation is a major cause of impaired endometrial receptivity and infertility. Mast cells, as resident immune cells in the endometrium, can disrupt embryo implantation when hyperactivated due to increased local inflammation. Vitamin D, acting as an immunomodulator, potentially plays a role in maintaining endometrial homeostasis by regulating mast cell activity. The present study was conducted with aim to histopathologically investigate the effects of vitamin D on mast cell count and degranulation patterns in the rat endometrium during the pre-implantation period.

Methods: In this experimental study, 20 adult female NMRI mice were randomly divided into control and experimental (vitamin D-treated) groups. Three and a half days after inducing pseudopregnancy in both groups, tissue samples were obtained from the middle third of the uterine horn to prepare histological sections. Using Toluidine Blue staining, the total number of mast cells and their degranulation status—categorized into granulated, semi-granulated, and degranulated patterns—were evaluated. Data were analyzed using generalized estimating equations (GEE) with a Poisson distribution.

Results: The histopathological findings indicated that vitamin D administration decreased the mean number of endometrial mast cells, although this reduction was not statistically significant (p=0.508). The incidence rate ratio (IRR) of granulated mast cells in the vitamin D group compared to the control group decreased, which was also not statistically significant (p=0.455). Conversely, the incidence rate of semi-granulated mast cells showed an increase, though this difference lacked statistical significance (p=0.677). Furthermore, the incidence rate ratio for degranulated mast cells was 0.58, indicating a decrease, but this difference was likewise non-significant (p=0.386).

Conclusion: Although vitamin D did not cause statistically significant differences in mast cell counts, it likely mitigates endometrial inflammation by reducing their activation, thereby fostering a more favorable environment for the implantation process. This biological effect may hold importance in improving the endometrial microenvironment and reducing infertility; however, confirmation requires further studies with larger sample sizes.

Keywords: Cell Degranulation, Endometrium, Infertility, Mast Cells, Pre-Implantation, Vitamin D

► **Please cite this article as:**
Mosayebi Z, Beigi Boroujeni M, Tavafi M, Beigi Boroujeni N. Histopathological Evaluation of the Effect of Vitamin D on Mast Cell Count and their Degranulation Pattern in the Mouse Uterine Endometrium at Pre-Implantation Time. **Iran J Obstet Gynecol Infertil** 2026; 29(5):62-71. **DOI:** 10.22038/ijogi.2026.98340.6808