

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی

عنوان

تأثیر تزریق داخل تخمدانی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان و محیط
کشت بهینه شده ی آن بر پارامترهای مورفومتریک و هیستولوژیک رحم و نیز سطح هورمون
استروژن و بیان گیرنده های آن در موش صحرایی مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک

توسط

ریحانه نقیب زاده تهامی زرنندی

استاد راهنما

دکتر طاهره حق پناه

اساتید مشاور

دکتر سید نورالدین نعمت الهی ماهانی / دکتر سمیه صلح جو

سال تحصیلی (تیر ۱۴۰۳)

شماره پایان نامه:



بسمه تعالی

تاریخ: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

شماره: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

کد اخلاق:

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی خانم ریحانه نقیب زاده دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان "تأثیر تزریق سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از جریب انسان و محیط کشت بهینه شده ی آن بر پارامترهای مورفومتریک و هیستولوژیک رحم و نیز سطح هورمون استروژن و بیان گیرنده های آن در موش صحرایی مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک" در ساعت ۹ روز چهارشنبه مورخ ۱۴۰۳/۴/۲۰ حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استادان راهنما	سرکار خانم دکتر طاهره حق پناه	
ب: استادان مشاور	جناب آقای دکتر سید نورالدین نعمت الهی سرکار خانم دکتر سمیه صلح جو	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر مسعود عزت آبادی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	سرکار خانم الهام جعفری	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر سجاد سیدین	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه و نمره ۱۸/۹۲ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی
دانشگاه علوم پزشکی کرمان

توجه: دانشجویان حداکثر ۵ روز بعد از تاریخ دفاع از پایان نامه ملزم به انجام امور تسویه حساب و فراغت از تحصیل می باشد.

اظهار نامه (مربوط به انتشار رساله/پایان نامه)

اینجانب ریحانه نقیب زاده تهمامی زرنندی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان نویسنده پایان نامه «تأثیر تزریق سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان و محیط کشت بهینه شده ی آن بر پارامترهای مورفومتریکی و هیستولوژیک رحم و نیز سطح هورمون استروژن و بیان گیرنده های آن در موش صحرایی مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک» تحت راهنمایی دکتر طاهره حق پناه متعهد می شوم:

تحقیقات در این رساله / پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.

در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد کرده ام.

مطالب مندرج در رساله / پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نگردیده است.

کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی کرمان است. مقالات مستخرج با نام "دانشگاه علوم پزشکی کرمان" و یا "Kerman University of Medical Sciences" به چاپ خواهد رسید.

حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی رساله / پایان نامه تأثیر گذار بوده اند را در مقالات مستخرج از رساله / پایان نامه رعایت کنم و در تمامی آنها نام استاد(ان) راهنما به عنوان نویسنده مسئول و نیز نام استاد(ان) مشاور و نشانی الکترونیکی دانشگاهی آنان را قید نمایم.

در کلیه مراحل انجام این رساله / پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی داشته یا از آنها استفاده کرده ام، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق پژوهشی را رعایت نموده ام.

امضای دانشجو:

تاریخ: تیرماه ۱۴۰۳

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه علوم پزشکی کرمان می باشد. این مطلب، باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مذکور ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در رساله / پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

سپاس ایزد منان که در تمام مراحل زندگیم مرا قوت قلب بوده است. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید. خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نسبیم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند.

بسی شایسته است تقدیر و تشکر از استاد محترم:

خانم دکتر طاهره حق پناه

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که بهترین پشتیبان بود؛

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلبه ایثار و از خود گذشتگی؛

به پاس قلب بزرگشان که فریاد رس بود و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت میگرایید؛

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نکرد.

از اساتید فرزانه و دلسوزم

جناب آقای دکتر سیدنورالدین نعمت اللهی ماهانی و سرکار خانم دکتر سمیه صلح جو

بابت مشاوره و یاری بی دریغشان در انجام این پژوهش بی نهایت سپاس گزارم.

همچنین از اساتید بزرگوار

جناب آقای دکتر مسعود عزت آبادی پور

جناب آقای دکتر شهریار دبیری

که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

سزاوار است سپاسی بگذارم شایسته و آکنده از ادب و احترام برای وجود سرشار از ایثار و بزرگواری اساتید گرانقدرم:

که تاثیر علم آموزیشان، چراغ روشن هدایت را بر کلبه محقر وجودم فروزان ساخت و با کرامتی چون خورشید، سرچشمه

دل را روشنی بخشید و گلشن سرای علم و دانش را با راهنماییهای کارساز و سازنده، بارور نمودند.

در نهایت از تمام دانشجویان و دوستانی که در مراحل انجام این کار تحقیقاتی در کنار من بودند، تشکر می کنم.

این پایان نامه را در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به

دل نشین ترین تصنیف های خداوند، یگانه تکیه گاه زندگیم:

"پدر و مادر عزیزم"

که از نگاهشان صلابت

از رفتارشان محبت

و از صبرشان ایستادگی را آموختم.

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
فهرست جداول	ك
فهرست تصاویر	ل
چکیده	ع

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱- بیان مسئله و اهمیت موضوع	۲
۱-۱-۱- ناباروری و سندروم تخمدان پلی کیستیک	۲
۱-۱-۲- تاریخچه و تعریف PCOS	۲
۱-۱-۳- شیوع سندروم PCOS در جهان و ایران	۳
۱-۱-۴- نشانگان PCOS	۴
۱-۱-۵- هورمون استروژن و گیرنده های آن	۵
۱-۱-۶- رحم و فیزیولوژی آن در فازهای مختلف سیکل قاعدگی	۶
۱-۱-۷- هورمون استروژن و درگیری آن در فازهای مختلف سیکل قاعدگی	۶
۱-۱-۸- تغییرات سطح استروژن و بیان گیرنده های آنان در زنان مبتلا به سندروم PCOS	۷
۱-۱-۹- تغییرات اندومتر رحم زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک	۷
۱-۱-۱۰- درمان سندروم تخمدان پلی کیستیک	۸
۱-۱-۱۰-۱- اصلاح سبک زندگی	۸
۱-۱-۱۰-۲- داروهای شیمیایی	۸
۱-۱-۱۰-۳- درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی	۹
۱-۱-۱۱- هدف کلی طرح	۱۲
۱-۱-۱۲- اهداف اختصاصی طرح	۱۲

۱۳-۱-۱- هدف کاربردی طرح..... ۱۳

۱۴-۱-۱- فرضیات یا سؤالات پژوهش (با توجه به اهداف طرح)..... ۱۳

فصل دوم: بررسی متون

۱-۲- مقدمه..... ۱۶

۲-۲- مطالعات انجام شده بر روی نقش استروژن و گیرنده های آن در سندروم تخمدان پلی کیستیک..... ۱۶

۳-۲- مطالعات انجام شده بر تغییرات مورفولوژی و بافت شناسی رحم در سندروم تخمدان پلی کیستیک..... ۱۷

۴-۲- مطالعات انجام شده بر روی استفاده از سلول های بنیادی و محیط کشت بهینه شده بر درمان بیماری

های تخمدان..... ۱۸

فصل سوم: مواد و روش ها

۱-۳- مقدمه..... ۲۳

۲-۳- نوع مطالعه..... ۲۳

۳-۳- مکان و زمان انجام مطالعه..... ۲۳

۴-۳- معیارهای ورود به مطالعه..... ۲۳

۵-۳- معیارهای خروج از مطالعه..... ۲۳

۶-۳- مواد و تجهیزات استفاده شده..... ۲۳

۷-۳- حیوانات و روش نگهداری..... ۲۶

۸-۳- بررسی وضعیت چرخه استروس..... ۲۷

۹-۳- القاء سندروم تخمدان پلی کیستیک..... ۲۸

۱۰-۳- گروه های آزمایش مطالعه..... ۲۹

۱۱-۳- آزمایشات مرتبط با آماده سازی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی..... ۳۱

۱-۱۱-۳- جدا سازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی..... ۳۱

۲-۱۱-۳- پاساژ سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی..... ۳۲

- ۳-۱۱-۳- شمارش سلولی و آزمون حیات سلولی ۳۲
- ۳-۱۱-۴- انجماد سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی ۳۳
- ۳-۱۱-۵- ذوب سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی ۳۳
- ۳-۱۲- نشانه گذاری سلول ها با رنگ فلوئورسنت PKH 26 قبل از پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی ۳۴
- ۳-۱۳- تهیه محیط کشت بهینه از سلول های مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان ۳۵
- ۳-۱۴- پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و محیط کشت بهینه حاصل از آن ۳۵
- ۳-۱۵- اندازه گیری وزن بدن حیوانات ۳۶
- ۳-۱۶- اندازه گیری وزن رحم حیوانات ۳۷
- ۳-۱۷- ارزیابی سطح سرمی استرادیول ۳۸
- ۳-۱۸- رنگ آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین ۳۸
- ۳-۱۹- شیوه انتخاب مقاطع برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین ۳۹
- ۳-۲۰- ارزیابی مورفومتری و هیستولوژیک رحم ۴۰
- ۳-۲۱- بررسی بیان پروتئین به روش وسترن بلاتینگ ۴۲
- ۳-۲۱-۱- استخراج پروتئین از بافت رحم ۴۲
- ۳-۲۱-۲- بافرها و محلولهای مورد استفاده برای انجام وسترن بلاتینگ ۴۳
- ۳-۲۱-۳- بافر ژل پایین ۴۳
- ۳-۲۱-۴- بافر ژل بالا ۴۳
- ۳-۲۱-۵- بافر الکتروفورز (RUNNING BUFFER 1X) ۴۴
- ۳-۲۱-۶- بافر نمونه (LOADING OR SAMPLE BUFFER 5X) ۴۴
- ۳-۲۱-۷- بافر انتقال (TRANSFER BUFFER) ۴۴
- ۳-۲۱-۸- بافر TBS (10X) ۴۴

- ۹-۲۱-۳- بافر مسدود کننده (BLOCKING BUFFER) ۴۵
- ۱۰-۲۱-۳- محلول استوک آکريل آميد (۳۰/۸ درصد) ۴۵
- ۱۱-۲۱-۳- محلول پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد ۴۵
- ۱۲-۲۱-۳- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۴۵
- ۱۳-۲۱-۳- تهیه غلظت‌های مختلف BSA برای کشیدن منحنی استاندارد ۴۶
- ۱۴-۲۱-۳- الکتروفورز ژل پلی آکريل آميد سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ۴۷
- ۱۵-۲۱-۳- روش SDS-PAGE و نحوه انجام آن ۴۷
- ۱۶-۲۱-۳- انتقال باندها (بلاتینگ) ۴۹
- ۱۷-۲۱-۳- مسدود کردن کاغذ PVDF ۵۱
- ۱۸-۲۱-۳- اتصال آنتی بادیها و شناسایی باندها ۵۱
- ۱-۱۸-۲۱-۳- روش انجام کار ۵۱
- ۲۲-۳- ملاحظات اخلاقی ۵۲
- ۲۳-۳- آنالیزهای آماری ۵۲

فصل چهارم: یافته‌ها

- ۱-۴- مقدمه ۵۵
- ۲-۴- تایید القای مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک ۵۵
- ۳-۴- تایید و تشخیص پیوند ASCS نشانه گذاری شده با PKH26 در تخمدان‌ها ۵۷
- ۴-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر وزن رحم ۵۸
- ۵-۴- پارامترهای بافت شناسی رحم ۵۹
- ۶-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ضخامت دیواره رحم ۶۳
- ۷-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ضخامت اندومتر رحم ۶۳
- ۸-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ارتفاع سلول های اپیتلیالی لومن رحم ۶۴

۹-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ارتفاع سلول های اپیتلیالی غدد رحم ۶۵

۱۰-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر سطح هورمون سترادیول ۶۶

۱۱-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر بیان پروتئین گیرنده های استروژن ۶۷

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۱-۵- بحث ۷۰

۲-۵- نتیجه گیری ۷۵

منابع ۷۶

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۳: مواد استفاده شده.....	۲۴
جدول ۲-۳: تجهیزات استفاده شده.....	۲۶
جدول ۳-۳: مراحل آگیری بافت.....	۳۸
جدول ۴-۳: مراحل رنگ آمیزی بافت رحم با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین.....	۴۰
جدول ۵-۳: ترکیبات لازم برای ساخت محلول برادفورد.....	۴۶
جدول ۶-۳: مواد تشکیل دهنده ژل پایین (۱۲/۵ درصد).....	۴۸
جدول ۷-۳: مواد تشکیل دهنده ژل بالا (۵ درصد).....	۴۹
جدول ۸-۳: رقت آنتی بادیهای اولیه مورد استفاده.....	۵۲

فهرست تصاویر

عنوان	صفحه
شکل ۱-۳: نحوه گرفتن اسمیر واژینال از موش صحرایی	۲۷
شکل ۲-۳: القای سندروم تخمدان پلی کیستیک	۲۹
شکل ۳-۳: گروه‌های مورد مطالعه. CMC= CARBOXYMETHYLCELLULOSE و D=DAY	۳۰
شکل ۳-۴: مراحل استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسان (A-F). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (F) (پاساژ چهارم × 400)	۳۲
شکل ۳-۵: مراحل پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و محیط کشت بهینه حاصل از آن، نرمال سالین و محیط کشت پایه به داخل بافت تخمدان (۷-۱)	۳۶
شکل ۳-۶: اندازه گیری وزن بدن حیوانات با استفاده از ترازوی دیجیتالی	۳۷
شکل ۳-۷: ارزیابی هیستومورفومتری	۴۱
شکل ۳-۸: نحوه قرار گرفتن ژل و کاغذ PVDF بین صفحات کاغذ صافی و قطبهای مثبت و منفی (۱۲۵).	۵۰
شکل ۴-۱: تایید مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک	۵۶
شکل ۴-۲: تایید و تشخیص پیوند ASCS نشانه گذاری شده با PKH26 در تخمدان‌ها	۵۷
شکل ۴-۳: تاثیر پیوند تخمدانی ASC و ASC-CM به مدل موش PCOS بر وزن رحم (A) و نسبت وزن رحم به بدن (B)	۵۸
شکل ۴-۴: تصاویر میکروسکوپی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین از سلول‌های اپی تلیالی شاخ رحم موش صحرایی	۶۰
شکل ۴-۵: رنگ آمیزی H&E غدد اندومتر موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف	۶۱
شکل ۴-۶: تراکم غدد در اندومتر گروه‌های مختلف	۶۲
شکل ۴-۷: تاثیر پیوند تخمدانی ASC و ASC-CM بر ضخامت دیواره رحم در مدل موش PCOS. $P \leq 0.05$	۶۳

شکل ۴-۸: فتومیکروگراف-های رحم موش صحرایی گروه‌های مختلف از نظر ضخامت اندومتر (نوارهای

نقطه چین)، رنگ آمیزی شده با همتوکسیلین و ائوزین ۶۴

شکل ۴-۹: A. فتومیکروگراف سلول‌های اپی‌تلیالی مجرای رحم در گروه‌های مختلف ۶۵

شکل ۴-۱۰: A. فتومیکروگراف غدد رحم در گروه‌های مختلف ۶۶

شکل ۴-۱۱: تأثیر پیوند تخمدانی ASC و ASC-CM به مدل موش PCOS بر سطح سرمی استرادیول. .. ۶۷

شکل ۴-۱۲: تأثیر تجویز ASC و ASC-CM بر سطح بیان پروتئین ۶۸

فهرست کوتاه نوشته‌ها

GNRH	Gonadotropin-releasing hormone
LH	Luteinizing hormone
FSH	Follicle-stimulating hormone
ER	Estrogen receptor
BMI	Body mass index
VEGF	Vascular endothelial growth factor
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
HGF	Hepatocyte growth factor
ASC	Adipose Stem Cells
GPOR	G-protein coupled receptor
MMP	Matrix metalloproteinases
POI	Premature ovarian insufficiency
LIF	leukemia inhibitory factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
IUF	intrauterine fluid accumulation
CMC	Carboxymethyl cellulose
PBS	Phosphate-buffered saline
DMEMF12	Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F12
FBS	Fetal bovine serum
DMSO	Dimethyl sulfoxide

RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine
PVDF	Polyvinylidene difluoride
LEC	Luminal epithelial cell
GEC	Glandular epithelial cell
ERE	estrogen response elements
PCOS	Poly cystic ovary syndrome

چکیده

مقدمه و اهداف: با توجه به ارتباط بین عملکرد رحم و سطح هورمون تخمدانی و از سویی گزارشات اخیر مبنی بر اثرات مثبت پیوند محیط بهینه شده ی حاصل از سلول های بنیادی چربی (ASC-CM) بر فنوتیپ سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS^۱)، این مطالعه، برای اولین بار، اثر پیوند داخل تخمدانی ASC-CM را در مقایسه با ASC، بر وضعیت تغییر یافته رحم، سطح استروژن و همچنین بیان گیرنده های آن در موش صحرایی مدل PCOS مورد ارزیابی قرار می دهد.

روش ها: ۲۵ موش صحرایی ماده نژاد ویستار به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند شامل گروه CMC که ۱% مجلول کربوکسی متیل سلولز را دریافت کرد و گروه PCOS که ۱ میلی گرم بر کیلوگرم لتروزول دریافت کرد. پس از تأیید القا PCOS، حیوانات PCOS به چهار زیرگروه تقسیم شدند: ۱. PCOS-ASC (دریافت 2×10^6 سلول بنیادی چربی)، ۲. PCOS-ASC-CM. (دریافت محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول های بنیادی چربی)، ۳. PCOS-Media (دریافت محیط کشت پایه) و ۴. PCOS-Vehicle (دریافت نرمال سالین). بیست و چهار روز پس از تجویز، وزن حیوانات اندازه گیری شد و سپس کشته شدند. بافت های رحم برداشت شده و وزن گیری شدند. اندازه گیری های هیستومورفومتريک و همچنین ایمونوبلاتینگ گیرنده های استروژن ($ER\alpha$ و $ER\beta$) رحم انجام شد. همچنین، سرم ها برای ارزیابی سطح هورمون استروژن جمع آوری شدند.

یافته ها: شرایط هیستوپاتولوژیک رحمی از قبیل تغییر سلول های اپیتلیالی پوشاننده لومن و غده ها و همچنین کاهش معنادار ارتفاع سلول های اپیتلیال لومن و غده ها در حیوانات PCOS بدون درمان (PCOS-) و V (PCOS-Media) نسبت به گروه CMC مشاهده شد. علاوه بر این، سطح استروژن و بیان هر دو گیرنده $ER\alpha$ و $ER\beta$ نیز کاهش یافت. به هر حال، تجویز ASC-CM در مقایسه با ASCs منجر به اثرات تخفیفی بیشتری در این پارامترهای تغییر یافته شد که با بررسی های بافت شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی تأیید شد.

¹ Polycystic ovarian syndrome

نتیجه‌گیری: پیوند ASC-CM در مقایسه با ASC، توانست تغییرات بافت شناسی استروژنیک بیش تری را در تغییرات وضعیت رحمی PCOS ایجاد کند که یک راه کار مفید تری برای بهبود وضعیت رحم فراموش شده در فنوتیپ‌های PCOS است.

کلمات کلیدی: سندروم تخمدان پلی کیستیک، سلول بنیادی مزانشیمی چربی، محیط کشت بهینه شده، رحم، هورمون استروژن، گیرنده های استروژنی

فصل اول

مقدمه و اهداف

۱-۱- بیان مسئله و اهمیت موضوع

۱-۱-۱- ناباروری و سندروم تخمدان پلی کیستیک

ناباروری یکی از مشکلات شایع جهان است که در حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد زوجین با آن مواجه هستند. علل ناباروری می تواند مربوط به مرد، زن و یا هر دو باشد. در میان مشکلات ناباروری زنان، بیماری های مرتبط با سیستم تولید مثل و اختلالات تخمدانی سهم بیشتری را به خود اختصاص داده است. سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از اختلالات مهم تخمدانی است که در حدود ۶ تا ۱۵ درصد زنان مبتلا به آن هستند و متأسفانه ۷۵ درصد آن ها دچار ناباروری می شوند.

۱-۱-۲- تاریخچه و تعریف PCOS

بیماری PCOS یکی از پیچیده ترین و در عین حال شایع ترین ناهنجاری اندوکرائنی در زنانی است که در سن بارداری قرار دارند. برای نخستین بار این بیماری توسط دکتر استین و لونتال در سال ۱۹۳۵ توصیف شد و به همین علت به نام سندروم استین-لونتال نیز نامگذاری شد. ولی بسیار پیش از آن، در سال ۱۳۲۸ میلادی علائم این بیماری توسط رابی لوی بن گرشوم فرانسوی ذکر شده بود (۱). تعاریف متعددی برای سندروم تخمدان پلی کیستیک در نظر گرفته شده است (۲). در سال ۱۹۹۰ سازمان بین المللی سلامت، تعدادی معیار تشخیصی برای PCOS تعریف کرد که عبارتند از: وجود نشانه های بالینی و بیوشیمیایی هایپرآندروژنیسم، هایپرپلازی مادرزادی آدرنال، هایپرپرولاکتینمیا، عدم تخمک گذاری مزمن، قاعدگی نامنظم و تومورهای ترشح کننده آندروژن (۳). تعریف دوم نظریه روتردام در سال ۲۰۰۳ است که حاصل همکاری مشترک بین انجمن اروپایی تولید مثل انسانی و جنین شناسی و انجمن آمریکایی طب تولید مثل می باشد. در این تعریف، تنها دارا بودن دو معیار از سه معیار برای تشخیص PCOS کفایت می کند: (۱) نشانه های بالینی و بیوشیمیایی هایپرآندروژنیسم، (۲) اختلال در عملکرد تخمدان (الیگواوولیشن یا عدم تخمک گذاری) (۳) ارزیابی تخمدان های پلی کیستیک از طریق سونوگرافی در نبود علل دیگر. نظریه روتردام طیف وسیع تری از معیارهای فنوتیپی مانند اختلال در تخمک گذاری و تخمدان های پلی کیستیک بدون هایپر آندروژنیسم و زنان

آمنوره با تخمدان‌های پلی کیستیک و هایپراندروژنیسم را مورد توجه قرار داده است (۴). با پررنگ شدن هایپراندروژنیسم در این سندروم، در سال ۲۰۰۶ سه ویژگی تشخیصی برای تایید PCOS در نظر گرفته شد: (۱) سندروم‌های مختلف مقاومت به انسولین، اختلال در عملکرد تیروئید، هایپرلاکتینمیا و سایر علت‌های هایپراندروژنیسم، (۲) نشانه‌های بالینی و بیوشیمیایی هایپراندروژنیسم، و (۳) اختلال در عملکرد تخمدان (الیگواوولیشن و یا عدم تخمک گذاری). انجمن مطالعات آندروژن و انجمن سندروم تخمدان پلی کیستیک در سال ۲۰۰۹ نیز به صورت مشترک بر اهمیت هایپراندروژنیسم در تخمدان پلی کیستیک تاکید کردند و علائمی را برای این بیماری مشخص نمودند: (۱) نشانه‌های بیوشیمیایی و بالینی هایپر آندروژنیسم و (۲) اختلال در مورفولوژی و عملکرد تخمدان و یا عدم تخمک گذاری (وجود بیش از ۱۲ فولیکول با قطر ۲ تا ۹ میلی‌متر در هر دو تخمدان و افزایش حجم تخمدان‌ها به بیش از ۱۰ میلی لیتر که نشان دهنده مورفولوژی تخمدان پلی کیستیک است) (۲).

۳-۱-۱- شیوع سندروم PCOS در جهان و ایران

در سراسر جهان شیوع این سندروم به طور قابل توجهی مشابه است. بطور مثال براساس معیارهای تشخیصی اولیه موسسه ملی بهداشت ایالات متحده آمریکا، این سندروم در ایالات متحده، آسیا، اروپا و استرالیا ۶ تا ۱۰ درصد جمعیت زنان در سنین باروری را درگیر نموده است. علاوه بر این بیش از ۲۰ درصد زنانی که مشکلات ناباروری دارند درگیر این بیماری هستند (۵). براساس طبقه بندی رتردام^۲، میزان شیوع این سندروم در ایران ۶/۱۴٪ تخمین زده شده است (۶). پاتوفیزیولوژی و علت سندروم تخمدان پلی کیستیک ناشناخته و پیچیده است (۷). اگرچه تظاهر اولیه سندروم تخمدان پلی کیستیک هنگام بلوغ رخ می‌دهد ولی منشاء اختلال در تولید آندروژن تخمدان می‌تواند مرتبط با دوران کودکی یا حتی در هنگام رشد جنینی باشد (۸). هایپر آندروژنیسم و اختلال در تخمک گذاری در اثر افزایش فرکانس ضربانی پایدار و سریع LH در افراد

² Rotterdam

بزرگسال و نوجوان مبتلا به PCOS ناشی از تحریک هورمون آزادکننده گنادوتروپین GnRH^۳ می شود که در نتیجه فراهم کننده زمینه برای تولید بیشتر زیر واحدهای بتای LH به جای FSH، افزایش سطح LH سرم و کاهش سطح هورمون FSH می گردد.

۴-۱-۱- نشانگان PCOS

این سندروم بر اساس نشانگان بالینی شامل چاقی، بی نظمی قاعدگی، اختلال در تخمک گذاری، آمنوره، کاهش و عدم تخمک گذاری، وجود چندین فولیکول آنترال در تخمدان و ظاهر پلی کیستیک تخمدان در سونوگرافی، نشانگان هورمونی شامل غلظت بالای تستوسترون آزاد سرم یا غلظت زیاد هورمون آنتی مولرین، افزایش نسبت هورمون لوتئینه کننده (LH)^۴ به هورمون محرک رشد فولیکولی (FSH)^۵ و نشانگان متابولیکی شامل مقاومت به انسولین، دیس لیپیدمی، اختلال تحمل گلوکز، دیابت نوع دوم و افزایش احتمال بروز بیماری های قلبی- عروقی تشخیص داده می شود (۹). در این سندروم، هماهنگی متابولیکی تخمدان دچار اشکال می شود و اختلال در رشد فولیکول و تغییر سیگنال های پاراکراینی داخل تخمدان موجب انباشته شدن فولیکول های آنترال کوچک در حاشیه تخمدان می گردد (۱۰، ۱۱). به هر حال تخمدان تنها بافت آسیب دیده ای این افراد محسوب نمی شود بلکه اختلال عملکرد در بافت چربی، مقاومت به انسولین در عضله اسکلتی، افزایش سطح سرمی فاکتورهای التهابی و تغییرات اندومتریال نیز مشاهده شده است (۱۲). همچنین افزایش تولید آندروژن در مبتلایان PCOS با اختلالات محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- گناد، فولیکولوژنز، تغییر در پروفایل هورمونی و سنتر استروژن مرتبط است (۱۳).

³ Gonadotropin-releasing hormone

⁴ Luteinizing hormone

⁵ Follicle-stimulating hormone

۵-۱-۱- هورمون استروژن و گیرنده های آن

استروژن ها گروهی از هورمون ها هستند که نقش مهمی در رشد طبیعی جنسی و تولید مثلی زنان دارند. تخمدان ها محل اولیه سنتز استروژن هستند، هر چند که در جسم زرد، جفت، غدد فوق کلیوی و سلول های چربی نیز هم ۱۷-بتا استرادیول تولید می شود. استروژن علاوه بر تنظیم چرخه قاعدگی بر روی دستگاه ادراری، قلب و عروق خونی، استخوان ها، سینه ها، پوست، مو، غشاهای مخاطی، عضلات لگن و مغز تأثیر می گذارد. صفات ثانویه جنسی مانند موهای ناحیه تناسلی و زیر بغل نیز با افزایش سطح استروژن شروع به رشد می کنند. استروژن از طریق گیرنده های استروژنی متعدد که شامل گیرنده استروژنی آلفا و بتا و گیرنده استروژن همراه با پروتئین G می باشد، رشد طبیعی تخمدان ها و رحم را کنترل می کند (۱۴). استروژن بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی -مانند کنترل عملکرد طبیعی سیستم تولیدمثلی- را از طریق گیرنده های استروژنی واسطه گری می کند و نقش کلیدی در سیستم اسکلتی-عضلانی، قلبی-عروقی و عصبی ایفا می کند (۱۵). گیرنده های استروژنی به عنوان خانواده گیرنده های هسته ای فاکتورهای رونویسی، نه تنها در هسته سلول بلکه در سیتوپلاسم و میتوکندری سلول ها نیز وجود دارند. در سال ۱۹۵۸، الود جنسن^۶ اولین گیرنده استروژنی $ESR\alpha$ را کشف نمود. متعاقباً دومین ژن گیرنده استروژن $ESR\beta$ در سال ۱۹۹۶ توسط جین اک گاستافسون^۷ کشف گردید. بعلاوه آنها مشاهده کردند که $ESR\beta$ به طور قابل توجهی در پروستات و تخمدان بیان می شود (۱۴، ۱۶). طبق مطالعات اخیر، توزیع گیرنده های استروژنی در انواع بافت ها گوناگون است. $ESR\alpha$ به طور عمده در رحم، سلول های تکای فولیکول های در حال رشد تخمدان، بیضه و روده بیان می شود، در حالی که $ESR\beta$ در سلول های گرانولوزای فولیکول های در حال رشد تخمدان، پروستات، روده بزرگ، کلیه ها، سیستم قلبی-عروقی و سیستم عصبی مرکزی یافت می شود (۱۴). $ESR\beta$ در رشد فولیکولی، کاهش آترزی و القای بیان ژن های خاص نقش مهمی دارد. در حالی که $ESR\alpha$ با تأثیر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز سبب مهار تخمک گذاری و رشد رحمی می شود (۱۷). قابل ذکر است که $ESR\alpha$ و $ESR\beta$ دارای ایزوفرم های گوناگونی هستند. واضح است که برخی از بیماری ها با سطح استروژن و گیرنده های آن مرتبط

^۶ Elwood Jensen

^۷ Jan-Ake Gustafsson

است. گیرنده‌های استروژن نقش مهمی در سرطان پستان دارد به گونه‌ای که در ۷۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان پستان بیان $ESR\alpha$ در آنها مثبت شده است. لذا بیان $ESR\alpha$ با بیولوژی سرطان پستان مرتبط بوده در حالی که $ESR\beta$ در هر دو بافت نرمال و بدخیم پستان بیان می‌شود (۱۸).

۶-۱-۱- رحم و فیزیولوژی آن در فازهای مختلف سیکل قاعدگی

رحم یک عضو عضلانی از سیستم تناسلی زنان است که وظایفی مانند قاعدگی، لانه‌گزینی، بارداری و زایمان را بر عهده دارد. این عضو از لحاظ بافت شناسی از سه لایه تشکیل شده است که از بیرون به داخل شامل پریمتر، میومتر و اندومتر می‌باشد. اندومتر رحم از اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده با غدد اگزوکرین و بافت هم‌بند خونی تشکیل شده که از جنین حمایت می‌کند (۱۹). وضعیت این لایه وابسته به هورمون است و فیزیولوژی آن به طور قوی به هورمون‌های استروئیدی که از تخمدان ترشح می‌شود، وابسته است به طوری که در طول هر ماه، همراه با تغییرات غلظت هورمون‌های استروئیدی (استروژن و پروژسترون)، وضعیت اندومتر از فازهای قاعدگی، تکثیری و ترشحي به صورت چرخه‌ای تغییر میکند (۲۰).

۷-۱-۱- هورمون استروژن و درگیری آن در فازهای مختلف سیکل قاعدگی

هورمون استروژن در فاز تکثیری با اتصال به گیرنده‌های خود، باعث افزایش تکثیر و فعالیت میتوزی سلول‌های اندومتری می‌شود که با بیان بالای گیرنده‌های استروژنی در اواخر فاز تکثیری همراه است. استروژن افزایش یافته باعث افزایش گیرنده‌های پروژسترونی نیز شده و اندومتر را قادر می‌سازد تا بعد از تخمک‌گذاری وارد فاز ترشحي شود (۲۱). در این فاز، پروژسترون مترشحه از جسم زرد، بیان گیرنده‌های استروژنی و بنابراین عملکرد استروژن را مهار کرده، مانع از تکثیر سلولی شده و بازبرنامه‌ریزی اندومتر را برای تمایز و آماده‌سازی برای پنجره لانه‌گزینی آغاز می‌کند (۲۱). در غیاب لانه‌گزینی جنین، کاهش سطح پروژسترون و استروژن خون ریزی قاعدگی را موجب شده و فاز قاعدگی آغاز می‌گردد (۲۲).

۸-۱-۱ - تغییرات سطح استروژن و بیان گیرنده های آن در زنان مبتلا به سندروم PCOS

در افراد مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک، اختلال در چرخه قاعدگی بسیار شایع می باشد که می تواند ناشی از عدم تعادلات هورمونی در این افراد باشد. در افراد مبتلا به این سندروم تغییراتی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان رخ میدهد که این تغییرات منجر به عدم تغییر سطح استروژن در گردش شده و مانند اوایل فاز فولیکولی، سطح آن ثابت می ماند (۱۹). سطوح تغییر نیافته این هورمون ها می تواند با اثر بر ظرفیت پذیرش رحمی، بیان نرمال ژن ها را تغییر داده، باروری افراد مبتلا را کاهش داده و میزان سقط خودبخودی را افزایش دهد.

به هر حال تغییرات سطح هورمون های استروژنی تخمدان همراه با تغییر بیان گیرنده های استروژنی ($ER\alpha$, $ER\beta$) در تخمدان و اندومتر رحم افراد مبتلا به این سندروم مشاهده می شود (۲۳). تغییر بیان این گیرنده ها با تغییر در مسیر سیگنال دهی آن ها می تواند بر فعالیت های سلولی مانند تخمک گذاری، فاز چرخه سلولی، تکثیر سلولی و تهاجم تأثیر بگذارد (۱۴). علاوه بر این، تغییر بیان گیرنده های استروژنی می تواند با ایجاد محیط استروژنی غیرطبیعی رحم، موجب تغییر ویژگی های اندومتر و کاهش پذیرش آن شده و در ایجاد سیکل های قاعدگی نامنظم، عدم موفقیت در لانه گزینی بلاستوسیست یا افزایش سقط خودبخودی جنین موثر باشد (۲۴).

۹-۱-۱ - تغییرات اندومتر رحم زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک:

بر اساس مطالعات انجام شده، افزایش میزان بیان ژن و پروتئین $ER\alpha$ (۲۵، ۲۶) و نیز تغییر نسبت $ER\beta/ER\alpha$ (۲۷، ۲۸) در اندومتر افراد مبتلا به این سندروم می تواند افزایش احتمال شانس هایپرپلازی اندومتر و سرطان رحم و نیز کاهش حفظ بارداری را توضیح دهد. با این حال در مطالعاتی که این سندروم را با لئروزول در موش های صحرایی القا کردند، ضخامت اندومتر و دیواره رحم کاهش می یابد (۲۹). به هر حال اندومتر مبتلایان PCOS در معرض تغییرات مورفولوژیکی، پاتولوژیکی (تغییرات ضخامت اندومتر) و مولکولی

(تغییرات بیان گیرنده های استروئیدی^۸ERs) قرار می گیرد که عوارض کوتاه مدت و طولانی مدت غیر قابل جبرانی خواهد داشت و می تواند میزان سقط و اختلال لانه گزینی را افزایش دهد و در نتیجه منجر به ناباروری در افراد مبتلا به این سندروم شود.

۱-۱-۱۰-۱ درمان سندروم تخمدان پلی کیستیک

۱-۱-۱۰-۱-۱ اصلاح سبک زندگی

طبق مطالعه انجام شده کنترل برنامه غذایی در طول ۱۲-۴ هفته سبب افزایش گلوبولین باند شونده به هورمون های جنسی، کاهش دوبرابری تستوسترون و کاهش سطح انسولین و وزن بیمار می شود (۳۰). همچنین محققین موفق شده اند در زمینه ی برطرف کردن اختلالات متابولیکی از جمله دیابت نوع ۲، کاهش سطح گلوکز، اضطراب و مقاومت به انسولین نتایج قابل قبولی را به دست آوردند بعلاوه در افراد مبتلا به PCOS راه رفتن با سرعت ۶ کیلومتر در ساعت نقش مهمی در القاء تخمک گذاری دارد (۳۱). Nybacka و همکاران نشان دادند که رژیم غذایی و/یا ورزش بدنی پس از چهار ماه بر بهبود عملکرد تخمدان و پارامترهای متابولیک در زنان دارای اضافه وزن نقش بسزایی دارد. آن ها دریافتند که شاخص توده بدنی (BMI)^۹ با مدیریت رژیم غذایی ۶ درصد، با ورزش ۳ درصد و با مداخلات ترکیبی ۵ درصد کاهش می یابد (۳۲).

۱-۱-۱۰-۲ داروهای شیمیایی

Fairly و همکارانش در مطالعه ای بر روی ۱۰۰ زن مبتلا به PCOS مقاوم به کلومیفن سیتراات گزارش کردند که استفاده از دوز پایین گنادوتروپین ها یک روش بی خطر و موثر در درمان سندروم تخمدان پلی کیستیک است. آنها دریافتند که با این روش، میزان تخمک گذاری افزایش یافته و میزان چند قلو زایی کاهش می یابد (۳۳). Kelly and Gordon در مطالعه خود نشان دادند که متفورمین در درمان هیرسوتیسم در زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک نقش بسزایی داشته ولی در میزان آندروژن آزاد تغییر معنی داری

^۸ Estrogen receptor

^۹ Body mass index

ایجاد نکرده است (۳۴). قابل ذکر است که استفاده از داروهای شیمیایی می تواند منجر به بروز سندروم تحریک پذیری شدید تخمدان در این افراد شود که عوارض جبران ناپذیری مانند ترومبوز، نارسایی قلبی و کلیوی، چند قلوژی و زایمان زودرس به همراه دارد (۳۵).

۳-۱۰-۱- درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی:

امروزه استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی امید به درمان ناباروری زنان و بازگرداندن عملکرد تخمدان را بیشتر کرده است.

بصورت کلی سلول های بنیادی دو ویژگی دارند: توانایی تمایز و توانایی خود تجدید پذیری (۳۶). سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های استرومایی هستند که دارای ظرفیت خود نوسازی هستند و همچنین تمایز چند خطی را خود تجدید می کنند (۳۷, ۳۸). این سلول های با ترشح فاکتورهای متعدد مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)^{۱۰}، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1)^{۱۱} و فاکتور رشد کبدی (HGF)^{۱۲} موجب بهبود ریز محیط تخمدانی و فولیکولوژنز و مهار آپوپتوز سلول های زایا و استرومایی می شود (۳۹). مطالعات حیوانی بسیاری نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی به دلیل توان بالای لانه گزینی و پیشبرد رگزایی قوی تر در بافت های آسیب دیده و همچنین توان تولید فاکتورهای رشد ترمیمی و ضد التهابی (۴۰)، نقشی اساسی را در ترمیم عملکرد تخمدان و رحم بازی می کنند (۴۱, ۴۲). سلول های بنیادی مزانشیمی را می توان از بافت های مختلفی مانند بند ناف، پولیپ اندومتر، خون قاعدگی، مغز استخوان، بافت چربی و غیره جدا کرد (۴۳, ۴۴).

دو روش برای استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی در بازیابی عملکرد تخمدان و به دنبال آن بازیابی عملکرد رحم در نظر گرفته شده است. اولین روش تزریق داخل وریدی از طریق ورید دمی به موش

¹⁰ Vascular endothelial growth factor

¹¹ Insulin-like growth factor-1

¹² Hepatocyte growth factor

آزمایشگاهی و موش صحرایی معرفی شده است. دومین روش تزریق این سلول‌ها بصورت موضعی به محل موردنظر می‌باشد (۴۵).

الف - درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی:

در میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی (ADCS)^{۱۳} به دلیل ظرفیت تمایز پایدار، قابلیت تکثیر سریع و تکنیک جداسازی آسان، یک مورد ایده آل در پزشکی در نظر گرفته می‌شود (۴۶). تجویز ASCs ها با توجه به ویژگی آنتی آپوپتیک آنها توانسته به بازیابی عملکرد تخمدان و افزایش قدرت باروری کمک کند (۴۲، ۴۷). ADCS انواع سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مانند VEGF (محرک رگ‌زایی) (۴۸)، FGF (تحریک سیگنالینگ سلول‌های گرانولوزا-تکا و افزایش بازسازی بافت رحم از طریق تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتلیال) (۴۹)، IGF1 (تنظیم عملکرد تخمدان و استروئیدوژنز) و فاکتور نکروز تومور یا TNF- α را ترشح می‌کنند و منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و ترشح فاکتورهای مختلف موثر بر آپوپتوز، تنظیم ایمنی، آنژیوژنیزس و فاکتورهای آنتی اکسیدانی می‌گردد. طبق مطالعات گذشته نیز مشخص شده است که VEGF، FGF و IGF منجر به رگ‌زایی، ترمیم بافت آسیب دیده و بهبود عملکرد اندام‌ها می‌شود (۵۰، ۵۱). هم‌چنین شجاع‌فر و همکارانش نشان دادند که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در کاهش سطح MDA و غلظت سرمی IL6 و TNF- α ، افزایش سطح SOD و بهبود عملکرد پیوند اتوگرافت^{۱۴} تخمدان موش نقش بسزایی دارد (۵۲). کیلیک و همکارانش نشان دادند که درمان ترکیبی ADSCs و استروژن باعث بازسازی بافت اندومتر آسیب دیده می‌شود (۵۳). در مطالعه ای شائو^{۱۵} و همکاران نشان دادند که پیوند ADSC منجر به ترشح فاکتورهای تمایزی و ترمیم اندومتر آسیب دیده شده است (۵۴).

¹³ Adipose Stem Cells

¹⁴ auto grafted

¹⁵ Shao

ب- محیط غنی شده و درمان با محیط کشت بهینه شده

به هر حال، به دلیل جراحی‌های تهاجمی، کیفیت غیر قابل کنترل در هنگام آماده سازی، افزایش پاسخ ایمنی نسبت به پیوند و تومورزایی سلول‌های بنیادی، امروزه توجه بسیاری از محققین به استفاده از ترشحات یا سکرِتوم این سلول‌ها جلب شده است. به محیط کشتی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آن فاکتورهای مختلفی تحت عنوان سکرِتوم آزاد می‌کنند، محیط کشت بهینه شده می‌گویند (۵۵). آنالیز ترشحات (سکرِتوم) سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش‌های پروتئومیکس مشخص کرد که سکرِتوم، حاوی انواع فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی ماتریکس خارج سلولی و همچنین اگزوزوم‌های حاوی میکرو RNA می‌باشد که در تعدیل سیستم ایمنی از طریق مهار تکثیر و فعالیت سلول‌های T، سلول‌های B، سلول‌های NK، سلول‌های دندریتیک و همچنین القای سلول‌های T تنظیم کننده نقش بسزایی دارند (۵۶، ۵۷). مطالعات مختلف درمورد عوامل ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داده‌اند که این عوامل در غیاب سلول‌های بنیادی تحت شرایط مختلف قابلیت بازسازی بافت‌ها را دارد (۵۸). ترشحات (سکرِتوم) این سلول‌ها شامل دو گروه از فاکتورها می‌باشند. گروه اول، فاکتورهای تروفیکی هستند که ترمیم بافت آسیب دیده را از روش‌های مختلفی از جمله مهار آپوپتوز، جایگزینی سلول‌های آسیب دیده (از طریق القای تقسیم میتوز سلول‌های بالغ و یا تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی ساکن در بافت‌ها) و نیز از طریق القای رگزایی میسر می‌گردانند. گروه دوم، عواملی که از روش‌های مختلف موجب ایجاد تعدیل سیستم ایمنی و کاهش التهاب در بافت آسیب دیده می‌شوند (۵۹). تا کنون کاربرد محیط کشت بهینه‌ی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بهبود انواعی از بیماری‌ها مانند التهاب ریوی و سیستماتیک (۶۰)، استئوآرتریت (۶۱)، پانکراتیت حاد (۶۲) و ترمیم زخم ناشی از دیابت (۶۳) در حیوانات آزمایشگاهی گزارش شده است. شواهد زیادی نشان می‌دهند که استفاده از محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بهبود زخم، جوانسازی پوست، آسیب‌های قلبی، ایسکمی بافتی و سکنه مغزی نقش مهمی دارد. فاکتورهای پاراکرائینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت استفاده برای درمان بسیاری از اختلالات خود ایمنی و التهابی را دارد (۶۴-۶۶). مطالعات اخیر اثرات محافظتی

محیط کشت بهینه شده و یا آگزوزوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برخی از مدل‌های بیماری در حیوانات را گزارش کرده‌اند (۶۴, ۶۵, ۶۷, ۶۸). آنالیز پروتئومیکس محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاکی از وجود بیش از ۱۰۰ پروتئین (سیتوکین‌ها، کموکاین‌ها و فاکتور رشد) با فعالیت ضد التهابی، ضد فیبروتیکی و توانایی بازسازی می‌باشد (۶۶, ۶۹). محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی سبب بهبود التهاب در بیماری‌های ریوی و برونکوپولموناری می‌گردد (۷۰).

۱-۱-۱۱- هدف کلی طرح

تعیین اثر تزریق داخل تخمدانی سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان و محیط کشت بهینه شده ی آن بر پارامترهای مورفومتریک و هیستولوژیک رحم و نیز سطح هورمون استروژن و بیان پروتئین گیرنده های آن در موش صحرایی مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک

۱-۱-۱۲- اهداف اختصاصی طرح

۱. تعیین اثر تزریق داخل تخمدانی سلول مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر وزن رحم و نسبت وزن رحم به وزن بدن موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) و مقایسه آن با گروه CMC

۲. تعیین اثر تزریق داخل تخمدانی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر ضخامت اندومتر، ضخامت کل دیواره رحم، ارتفاع سلول های اپیتلیالی لومن رحم و ارتفاع سلول های اپی تللیالی غدد رحم موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) و مقایسه آن با گروه CMC

۳. تعیین اثر تزریق داخل تخمدانی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر سطح سرمی هورمون استروژن در سرم خون موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) و مقایسه آن با گروه CMC

۴. تعیین اثر تزریق داخل تخمدانی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر سطح بیان پروتئین $ER\alpha$ و $ER\beta$ (گیرنده های استروئیدی) در رحم موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) و مقایسه آن با گروه CMC

۱۳-۱-۱- هدف کاربردی طرح

از آن جا که سندروم تخمدان پلی کیستیک می تواند باروری زنان را مختل سازد، تاکنون تحقیقات بسیاری برای یافتن راه های درمانی مناسب، بدون عوارض جانبی انجام شده است. در این مطالعه سعی بر آن است تا روش های نوین سلول درمانی و نیز محیط بهینه شده ی بدون سلول را بر وضعیت رحمی مدل PCOS مورد بررسی قرار دهیم تا در صورت مشاهده ی نتایج مثبت احتمالی، بتوان گامی موثر در بهبود روش های درمانی این بیماری رایج زنانه برداشت.

۱۴-۱-۱- فرضیات یا سؤالات پژوهش (با توجه به اهداف طرح)

۱. تزریق سلول مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر وزن رحم و نسبت وزن رحم به وزن بدن در موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) در مقایسه آن با گروه CMC تاثیری ندارد.

۲. تزریق سلول مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر ضخامت اندومتر، ضخامت کل دیواره رحم، ارتفاع سلول های اپیتلیالی لومن رحم و ارتفاع سلول های اپی تلیالی غدد رحم موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) در مقایسه آن با گروه CMC تاثیری ندارد.

۳. تزریق سلول مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر سطح سرمی هورمون استروژن موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) در مقایسه آن با گروه CMC تاثیری ندارد.

۴. تزریق سلول مزانشیمی مشتق از چربی انسان و نیز محیط کشت بهینه شده حاصل از آن بر سطح پروتئین $ER\alpha$ و $ER\beta$ (گیرنده های استروئیدی) در رحم موش صحرایی مدل تخمدان پلی کیستیک (PCOS) در مقایسه آن با گروه CMC تاثیری ندارد.

فصل دوم

بررسی متون

۱-۲- مقدمه

این فصل دارای سه بخش اصلی است: بخش نخست به مطالعات انجام شده بر روی نقش استروژن و گیرنده‌های آن در سندروم تخمدان پلی کیستیک می‌پردازد. در بخش دوم نیز مطالعات انجام شده بر تغییرات مورفولوژیو بافت شناسی رحم در سندروم تخمدان پلی کیستیک بررسی خواهد شد و در بخش سوم مطالعات مربوط به درمان و نقش پزشکی بازساختی و تاثیر سلول درمانی و محیط کشت بهینه حاصل از آن بر سندروم تخمدان پلی کیستیک تشریح خواهند شد.

۲-۲- مطالعات انجام شده بر روی نقش استروژن و گیرنده‌های آن در سندروم تخمدان پلی کیستیک

ترشح استروژن و تعامل آن با گیرنده‌های مربوطه‌اش نقش برجسته‌ای در عملکرد نرمال تخمدان و تنظیم تکثیر و تمایز اندومتر رحم دارد. اختلال مداوم در سطح هورمون‌های جنسی زنان سبب تغییر عملکرد تخمدان و تشکیل کیست‌های تخمدانی که یکی از علائم سندروم تخمدان پلی کیستیک است، می‌گردد (۱۴). اختلال در گیرنده هورمون‌های جنسی استروئیدی منجر به نقص در تکامل فولیکولی و بیماری متابولیکی مانند چاقی، دیابت شیرین، بیماری‌های قلبی-عروقی و افزایش فشارخون در PCOS می‌گردد (۷۱). همچنین بیان غیر طبیعی $ESR\beta$ در تخمدان موش سبب اختلال در رشد فولیکول‌ها می‌شود (۷۲). افزایش تولید آندروژن در مبتلایان PCOS با اختلالات محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، فولیکولوز، تغییر در پروفایل هورمونی و سنتز استروژن مرتبط است. نشان داده شده که اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان سبب تشکیل کیست‌های فولیکولی می‌گردد. در اثر اختلال در تخمک گذاری، فولیکول کیستیک بدون دژنره شدن پایدار باقی می‌ماند و سبب بزرگ شدن کیست‌های فولیکولی می‌شود (۷۳). استروژن تخمدانی سبب تنظیم بلوغ فولیکولی و تحریک تکثیر GCs در طول رشد فولیکول می‌شود. اخیرا ارتباط بین $GPER^{16}$ و بلوغ تخمک گزارش شده است. مطالعه‌ای نشان داد که بلوغ تخمک‌های ماهی کپور در اثر مهار E2 کاهش یافت (۷۴). در مطالعه‌ی دیگری بر روی سلول‌های گرانولوزا-کومولوس در مبتلایان

¹⁶ G-protein coupled receptor

PCOS مشخص گردید که کاهش سطح E2 همراه با سطوح بالای GPER بلوغ تخمک را مهار می کند (۷۵). این مطالعات نشان دهنده‌ی نقش مهم GPERs در بلوغ تخمک است و استروژن‌ها با فعال کردن گیرنده استروژنی GPER بلوغ میوزی تخمک‌ها را مهار می کنند. بعلاوه بیان گیرنده‌های جنسی استروئیدی در PCOS دچار اختلال می گردد (۷۶, ۷۷). در همین راستا آرتیمانی و همکارانش نشان دادند که بیان $ESR\alpha$ و $ESR\beta$ در مبتلایان PCOS بطور معنی داری کمتر از گروه کنترل بوده است (۱۷). مطالعه‌ای نشان داده که سطح بیان این گیرنده‌ها در سلول‌های کومولوس مبتلایان PCOS بطور قابل توجهی کمتر از افراد سالم است (۱۷). از آنجایی که در مبتلایان PCOS رشد فولیکول‌ها مختل می شود و از طرفی سنتز و ترشح استروژن در فولیکول‌های آنترال صورت می پذیرد که نقش مهمی در رشد بعدی فولیکول دارد، در نتیجه میزان سنتز و ترشح استروژن در این افراد دچار اختلال می گردد (۷۸). هم چنین مطالعات قبلی نشان داده اند که در افراد مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک میزان بیان ژن و پروتئین ER افزایش پیدا میکند و منجر به افزایش حساسیت اندومتر رحم به استروژن میشود که میتواند خطر هایپرپلازی رحم را افزایش دهد (۷۹).

۳-۲- مطالعات انجام شده بر تغییرات مورفولوژی و بافت شناسی رحم در سندروم تخمدان پلی

کیستیک

در یک مطالعه بیان کردند که خطر ابتلا به سرطان اندومتر در زنان مبتلا به pcos سه برابر بیشتر از زنان دیگر است (۸۰). افزایش خطر سرطان اندومتر در PCOS معمولاً با عدم تخمک گذاری مزمن و در نتیجه قرار گرفتن طولانی مدت در معرض استروژن بدون مخالفت و عدم فعالیت پروژسترون توضیح داده می شود (۸۱). در یک مطالعه نشان داده شد که در یک مدل موش PCOS تحت درمان با تزریق روزانه DHEA، رحم موش‌ها به دلیل افزایش ارتفاع اپیتلیال، زیر اپیتلیال و میومتر ضخامت بیشتری داشت. افزایش ضخامت در این بافت‌ها در نتیجه تغییرات در تکثیر سلولی، سازماندهی کلاژن و جذب آب مشاهده شد (۸۲). اما در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که در موش مدل PCOS که به واسطه estradiol valerate القا شده بود، سطح هورمون استروژن در PCOS کاهش پیدا می کند. همچنین نشان داده شده که ضخامت اندومتر، طول رحم، تعداد

غدد اندومتر رحم و ارتفاع اپیتلیال نیز نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا می کند. علاوه بر این، استروژنی که از تخمدان ترشح میشود میتواند باعث تغییر نوع و شکل اپی تلیوم لومن رحم و غدد شود (۸۳). در مطالعه دیگری که اثر *figus deltoidea* بر روی تغییرات بیوشیمیایی، هورمونی و هیستومتری موش صحرایی مدل PCOS که با لتروزول القا شده است را بررسی کرده، نشان داده شد که ضخامت اندومتر و اندازه غدد در PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا می کند (۲۹).

۴-۲- مطالعات انجام شده بر روی استفاده از سلول های بنیادی و محیط کشت بهینه شده بر درمان

بیماری های تخمدان

مطالعات حیوانی بسیاری نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی به دلیل توان بالای لانه گزینی و پیشبرد رگزایی قوی تر در بافت های آسیب دیده و همچنین توان تولید فاکتورهای رشد ترمیمی و ضد التهابی (۴۰)، نقشی اساسی را در ترمیم عملکرد تخمدان بازی می کنند (۴۱، ۴۲). طبق مطالعات انجام شده، پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی از جفت انسان (۴۲)، سلول های بنیادی مزانشیمی قاعدگی (۸۴) سبب بهبود ساختار و عملکرد تخمدان در مدل های حیوانی نارسایی زودرس تخمدان ^{۱۷}POF القا شده با شیمی درمانی گردیده است. درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در برابر آپوپتوز و آسیب DNA سلول های جنسی در موش های شیمی درمانی شده نقش حفاظتی دارد (۸۵). بعلاوه کلهری و همکارانش نشان دادند که تزریق سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بدلیل خواص آنتی اکسیدانی و ضد آپوپتوزی سبب بهبود فولیکولوژنز در مبتلایان PCOS می شود (۸۶). برخی مطالعات اثر محافظتی سلول های بنیادی مزانشیمی بر عملکرد تخمدان مدل POF را تایید کرده است (۸۷، ۸۸). از دیگر خواص این سلول ها می توان به اثرات ضد فیبروتیک آن ها اشاره کرد. فیبروز تخمدان مرتبط با فعالیت برخی سایتوکین ها مانند MMP ها^{۱۸}، مهارکننده بافتی MMP ها، VEGF و اندوتلین-۱ می باشد که سلول های بنیادی با مهار تکثیر

¹⁷ Premature ovarian failure

¹⁸ Matrix metalloproteinases

فیبروبلاست‌ها، مانع از رسوب ماتریکس خارج سلولی می‌شوند (۸۹). از سویی رگ زایی^{۱۹} مکانیسم مهمی در بهبودی تخمدان به شمار می‌آید. فاکتورهای مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مانند VEGF و آنژیوژنین سبب ایجاد نئوواسکولاریزاسیون و تسهیل خونرسانی به بافت‌های آسیب دیده تخمدان می‌گردد (۸۹، ۹۰). پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ترشح فاکتورهای متعدد سبب بهبود عملکرد تخمدان و مهار پیری در تخمدان می‌شود (۹۱).

Sun و همکارانش نشان دادند که ASCها به طور قابل توجهی سبب بهبود عملکرد تخمدان پس از آسیب تخمدانی ناشی از شیمی درمانی می‌شود. آنها گزارش کردند که تزریق داخل وریدی و موضعی ASCs سبب افزایش تعداد فولیکول و تخمک، و کاهش آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در موش‌های مدل POF می‌شود (۴۷). همچنین Takehara و همکارانش مشاهده کردند که پیوند داخل تخمدانی ASCs 2×10^6 در موش‌هایی که داروی ضدسرطانی سیکلوفسفامید را دریافت کرده‌اند سبب القای رگ زایی، بهبود فولیکولوژنز و عملکرد تخمدان شده است (۹۲). در مطالعه‌ی Ding و همکارانش، نشان داده شد که فاکتورهای رشد مترشحه از ASCs در طی پیری با کاهش استرس اکسیداتیو از طریق فعال سازی مسیر سیگنالینگ SIRT1/FOXO1 سبب بهبود عملکرد تخمدان می‌گردد (۹۳). Su و همکارانش نشان دادند که پیوند ASCs بر روی داربست کلاژنی نسبت به پیوند آن به تنهایی سبب حفظ کوتاه مدت و بلندمدت این سلول‌ها شده که به نوبه خود تاثیر بسزایی در بهبود عملکرد تخمدان مانند چرخه استروس، سطح سرمی استرادیول و نمو فولیکولی در موش‌های مدل POI^{۲۰} دارد (۴۲). بعلاوه درمان ترکیبی ADSCs و استروژن باعث بازسازی بافت اندومتر آسیب دیده می‌شود (۵۳).

تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی قاعدگی و محیط کشت بهینه‌ی آن (۸۴) و نیز تزریق داخل تخمدانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و محیط کشت بهینه‌ی آن (۹۴) در

^{۱۹} Angiogenesis

^{۲۰} Premature ovarian insufficiency

موش مدل POF سبب بهبود ریز محیط و عملکرد تخمدان با کاهش آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا و فیبروز بینابینی تخمدانی شده است.

بعلاوه محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی سبب بهبود ذخیره تخمدان، باروری، کاهش آپوپتوز و محافظت از تخمدان در برابر آسیب‌های ناشی از شیمی درمانی در موش مدل POF شده است (۹۵).

Hong و همکاران نشان دادند که محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف سبب کاهش آپوپتوز در تخمک‌ها و سلول‌های گرانولوزای موش‌های مدل POF شده است (۹۶).
جعفرزاده و همکارانش نشان دادند که غنی سازی محیط کشت بلوغ تخمک^{۲۱} با محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سبب بهبود بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای تخمک موش شده است (۹۷).

Lee و همکارانش گزارش کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی و محیط کشت بهینه شده حاصل از آن با تنظیم بیان ژن‌های گیرنده فاکتور رشد، آپوپتوز و گسترش کومولوسی^{۲۲} بر بلوغ تخمک و رشد جنین تاثیر مثبتی دارد (۹۸).

همچنین بازوبندی و همکارانش در مطالعه ای نشان دادند که پیوند محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر کاهش و بهبود فیبروز رحمی پس از کورتاژ اندومتر در خرگوش نقش موثری را داشته است (۹۹). در مطالعه که شائو همکارانش انجام دادند نشان داده شد که ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی سبب افزایش سنتز کلاژن، بیان اینتگرین $\beta 3$ ، فاکتور مهارکننده لوسمی (LIF^{۲۳}) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF^{۲۴}) و نهایتاً بهبود بازسازی اندومتر می شود (۱۰۰). همچنین

²¹ In vitro maturation medium

²² Cumulus expansion

²³ leukemia inhibitory factor

²⁴ vascular endothelial growth factor

محیط کشت بهینه سلول های بنیادی مزانشیمی چربی منجر به کاهش IL6 و افزایش غلظت IL10 در مایع داخل رحمی (IUF^{۲۵}) شده است (۱۰۱).

در مطالعه اخیرمان که خانم شفيعی و همکاران انجام دادند نشان داده شد که پیوند محیط کشت بهینه شده حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی چربی منجر به بهبود وضعیت تخمدان و فولیکوژنز در موش صحرایی مدل PCOS شد (۱۰۲).

بنابراین از آن جا که گزارشات اخیر اثرات مثبت محیط بهینه شده حاصل از سلول های بنیادی چربی را بر سطح استروژن و نیز وضعیت هیستوپاتولوژیک تخمدان PCOS نشان داده اند و از سویی عملکرد رحم به وضعیت هورمون های مترشح از تخمدان، وابستگی شدیدی دارد و تغییرات متعدد بافت رحم در مبتلایان به این سندروم گزارش شده است، در مطالعه ی حاضر به بررسی اثر پیوند تخمدانی سلول های مزانشیمی چربی انسان یا محیط کشت بهینه شده ی حاصل از آن بر تغییرات مورفولوژی و هیستولوژیک رحم در موش صحرایی مدل PCOS پرداختیم. همچنین با توجه به تغییر سطح استروژن و بیان گیرنده های استروژنی در رحم این افراد و اهمیت این گیرنده ها بر مسیرهای سیگنالینگ هورمون استروژنی، تغییرات احتمالی میزان هورمون استروژن و بیان این گیرنده ها در رحم موش های صحرایی مدل PCOS به دنبال سلول درمانی و تجویز محیط کشت بهینه شده بر تخمدان نیز بررسی شد.

²⁵ intrauterine fluid accumulation

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۱-۳- مقدمه

موضوعات مطرح شده در این فصل شامل: نوع مطالعه، مکان و زمان انجام مطالعه، مواد و تجهیزات استفاده شده، متغیرهای مورد ارزیابی، روش اجرای طرح و گردآوری داده‌ها، ملاحظات اخلاقی، محدودیت‌های مطالعه و روش تجزیه و تحلیل داده‌ها است.

۲-۳- نوع مطالعه

این مطالعه از انواع مطالعات تجربی آزمایشگاهی حیوانی (بنیادی) می‌باشد.

۳-۳- مکان و زمان انجام مطالعه

این مطالعه در سال ۱۴۰۱-۱۴۰۲ در گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی افضلی پور دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد.

۴-۳- معیارهای ورود به مطالعه

در این پژوهش از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۲۰ گرم که دارای ۲ تا ۳ دوره‌ی استروس منظم بودند استفاده شد.

۵-۳- معیارهای خروج از مطالعه

موش‌های صحرایی ماده که دارای ۲ تا ۳ دوره‌ی استروس نامنظم بودند، وارد مطالعه نشدند.

۶-۳- مواد و تجهیزات استفاده شده

اطلاعات مربوط به مواد و تجهیزات استفاده شده در این مطالعه، در دو جدول ۱-۳ و ۲-۳ آمده است.

جدول ۱-۳: مواد استفاده شده.

ردیف	نام ماده	شرکت سازنده	کشور
۱	لتروزول	ابوریحان	ایران
۲	PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma	آمریکا
۳	Iso propranolol	Merck	آلمان
۴	Formaldehyde	مجللی	ایران
۵	Hematoxylinmonohydrate	Biobasic	کانادا
۶	دگزامتازون	Sigma	آلمان
۷	اسکوربیک ۳-فسفات	Sigma	آلمان
۸	Trypsin-EDTA	Sigma	آلمان
۹	محیط‌های کشت سلولی (DMEM) ^{۲۶}	Sigma	آلمان
۱۰	DMSO (dimethyl-sulfoxide)	Sigma	آلمان
۱۱	پنی سیلین استرپتومایسین	Sigma	آلمان
۱۲	سرم گاوی (FBS)	Cegrogen	آلمان
۱۳	کیت ECM815 (رنگ آمیزی Alizarin red)	A0100-3210	آلمان
۱۴	کیت A5268-10 (رنگ آمیزی Alcian blue)	Sigma	آلمان
۱۵	ظروف کشت سلول (فلاسک ۲۵ و ۷۵ سانتیمتر مربعی)	Sigma	آمریکا
۱۶	پلیت شش خانه	Spl	کره جنوبی
۱۷	آگارز الکتروفورز	Spl	آلمان
۱۸	DNA Staining Dyes (Green viewer)	Sigma	ایران

²⁶ Dulbecco's modified eagle medium

۱۹	ترايزول TRIZol/ Yzol pure RNA	parstous	ايران
۲۰	کيت ساخت cDNA	-	ايران
۲۱	Real QPlus Master Mix Green Without ROX	پارس طوس	آلمان
۲۲	دپس واتر	Ampliqon	Merck
۲۳	Ladder 100	آلمان	آلمان
۲۴	سر سمپلر زرد RNase, DNase Free	Merck	کره جنوبي
۲۵	سر سمپلر آبی RNase, DNase Free	Spl	کره جنوبي
۲۶	سر سمپلر کریستالی RNase, DNase Free	Spl	Spl
۲۷	سر سمپلر معمولی (آبی- زرد- کریستالی)	کره جنوبي	کره جنوبي
۲۸	Microtube 1/5 cc	Spl	Spl
۲۹	Microtube 0/2 cc	کره جنوبي	Spl
۳۰	اپندورف 0.2CC DNAase, RNAase free	کره جنوبي	sigma
۳۱	Triton x-100	آمریکا	Merck
۳۲	Tween 20	آلمان	Sigma
۳۳	کتامين	آمریکا	alfasan
۳۴	زايلازين	هلند	alfasan
۳۵	زاييلين	هلند	ايران
۳۶	قرص PBS	مجللي	آلمان
۳۷	الکل ۹۶%	Biobench	ايران
۳۸	فالکون ۱۵	مجللي	ايران
۳۹	فالکون ۵۰	-	ايران
۴۰	رک فالکون مختلط	-	ايران
۴۱	ظرف نمونه	-	ايران
۴۲	رک تيپ آبی	-	ايران
۴۳	رک تيپ کریستالی	-	ايران

جدول ۲-۳: تجهیزات استفاده شده

ردیف	نام وسیله/دستگاه	شرکت سازنده	کشور
1	دستگاه سنجش رفتار اجتماعی (Three-chambered social task)	بهبود- تحقیق کرمان	ایران
2	جعبه باز (Open field task)	بهبود- تحقیق کرمان	ایران
3	نرم افزار Video tracking	برج صنعت- آزما	ایران
5	ترازو جهت توزین حیوانات	AND	ژاپن
6	ترازو جهت توزین دارو	Sartorin	آلمان
7	میکروسکوپ نوری	Nikon-50i	ژاپن
8	شیکر	Biorad	آمریکا
9	سانتریفیوژ یخچال دار	وین طب	ایران
10	دستگاه الکتروفورز	Biorad	آمریکا
11	دستگاه پردازش بافتی	دید سبز	ایران
12	دستگاه قالب گیری پارافین	علامه یارانه صنعت	ایران
13	دستگاه Heat block	رازی تجهیز	ایران
14	دستگاه فور	Memmert	آلمان

۷-۳- حیوانات و روش نگهداری

حیوانات از پژوهشگاه رویان تهران تهیه و در حیوان خانه دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان در شرایط

استاندارد حرارت ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$) و نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دسترسی آزادانه به آب و غذا

نگهداری شدند (۹۴).

۸-۳- بررسی وضعیت چرخه استروس

جهت بررسی وضعیت چرخه استروس حیوانات، از اسمیر واژینال و متعاقب آن رنگ آمیزی پاپانیکولائو استفاده شد. برای این کار، ابتدا سواب‌های پنبه‌ای مخصوص با آب مقطر استریل مرطوب شدند تا هنگام تهیه اسمیر واژینال از حیوانات به واژن حیوان آسیبی وارد نشود و همچنین سلول‌های موجود در دیواره‌ی واژن به سواب پنبه‌ای بچسبند. سپس سواب پنبه‌ای مرطوب شده به داخل واژن حیوانات فرو رفته و به آرامی چرخانده شد. سواب از واژن بیرون آورده شده و بلافاصله بر روی لام کشیده شد. سپس لام‌های خشک شده با استفاده از پاپانیکولائو رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus IX51) مشاهده شدند (شکل ۳.۱). اسمیر واژینال به مدت دو هفته هر روز از حیوانات تهیه و در نهایت موش‌هایی که در طی ۱۲ تا ۱۴ روز مشاهده اسمیر واژینال، دارای ۲ تا ۳ چرخه استروس منظم بودند، جهت انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب شدند. قابل ذکر است که اسمیر واژینال از روز ۱۰ ام مطالعه تا پایان روز ۲۱ بصورت روزانه بررسی شد.

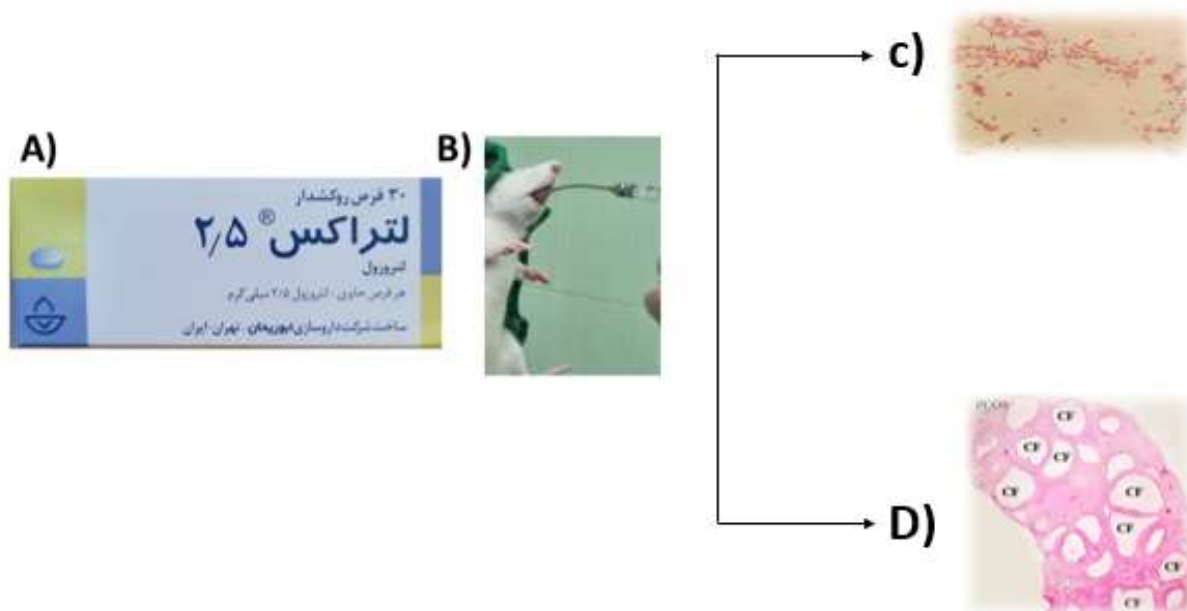


شکل ۱-۳: نحوه گرفتن اسمیر واژینال از موش صحرایی

۹-۳- القاء سندروم تخمدان پلی کیستیک

سندروم تخمدان پلی کیستیک در موش‌های صحرایی با استفاده از قرص لتروزول ۲/۵ میلی گرمی (لتراکس، داروسازی ابوریحان ایران) و به میزان ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن محلول در کربوکسی متیل سلولز (CMC)^{۲۷} یک درصد یا ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به صورت گاواژ دهانی و در طی ۲۱ روز متوالی القاء شد (۱۰۳). برای این کار، ابتدا CMC با نسبت معینی از آب، درون بشر آزمایشگاهی ریخته شد و مگنت درون آن قرار داده شد و به کمک دستگاه استیرر، محلول حاضر همگن شد. سپس قرص‌های لتروزول که با هاون آزمایشگاهی قبلاً پودر شده بودند به آن اضافه شد و به کمک استیرر در محلول آب و CMC همگن شد. محلول بدست آمده داخل فالكون ۵۰ میلی لیتری ریخته و جهت گاواژ حیوانات آماده شد. سپس با استفاده از سرنگ انسولین، حجم مورد نظر از دارو برای هر حیوان برداشته شد و با استفاده از نیدل گاواژ مخصوص موش صحرایی، دارو به حیوانات تجویز شد. پس از گذشت ۱۰ روز از گاواژ، از حیوانات اسمیر واژینال بصورت روزانه تا روز ۲۱ تهیه شد و لام‌ها با استفاده از رنگ پاپانیکولائو رنگ آمیزی شدند و با مشاهده افزایش مدت زمان فاز دای استروس و مت استروس که مشخصه نامنظم شدن چرخه‌های استروس بود، القاء مدل تخمدان پلی کیستیک تایید شد. همچنین تعداد ۴ حیوان به صورت تصادفی از هر گروه CMC و PCOS انتخاب و با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شدند و تخمدان آن‌ها خارج شد. تخمدان‌ها پس از پردازش بافتی، با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده و با مشاهده کیست‌های تخمدانی در مقاطع به دست آمده، القاء فنوتیپ مدل تخمدان پلی کیستیک تایید شد (شکل ۲-۳).

²⁷ Carboxymethyl cellulose



شکل ۲-۳: القای سندروم تخمدان پلی کیستیک .

(A) داروی لتروزول (لتراکس، داروسازی ابوریحان ایران) ، (B) گاوآژ دهانی داروی لتروزول در حیوانات گروه‌های آزمایش و (C) اسمیر واژینال در موش صحرایی و مشاهده فاز دای استروس با تعداد زیاد سلول‌های لکوسیت در زیر میکروسکوپ نوری، (D) بررسی هیستولوژی بافت تخمدان با افزایش تعداد کیستیک فولیکول به منظور تایید القا مدل PCOS.

۱۰-۳- گروه‌های آزمایش مطالعه

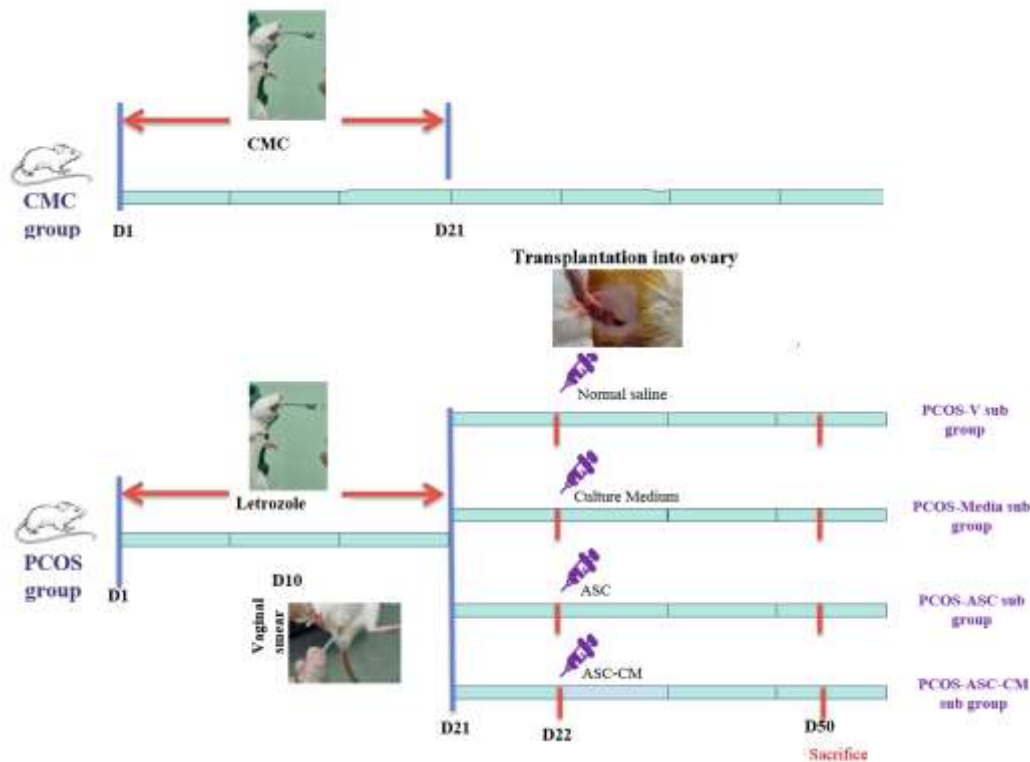
موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در گروه‌های مورد مطالعه زیرتقسیم بندی شدند (شکل ۳.۳):
 گروه CMC: موش‌های صحرایی که کربوکسی متیل سلولز یک درصد (10 mg/kg) را به عنوان حلال داروی لتروزول به صورت خوراکی دریافت کردند ($n=5$) (۱۰۳).
 گروه مدل PCOS: موش‌های صحرایی که ۲۱ روز داروی لتروزول را با دوز 1 mg/kg دریافت کردند (۱۰۳) (مدل PCOS). قابل ذکر است که ۴ سر موش اضافی در هر گروه برای تایید القای مدل مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تایید القای مدل بیماری در ۴ سر موش، به چهار زیر گروه ($n=5$ در هر زیر گروه) تقسیم شدند.

زیرگروه PCOS-V: موش‌های صحرایی ۲۱ روز داروی لتروزول با دوز 1mg/kg را دریافت نموده (مدل PCOS) و پس از آن ۲۰ میکرولیتر نرمال سالین به صورت موضعی به تخمدان‌ها تزریق شد.

زیرگروه PCOS-Media: موش‌های صحرایی ۲۱ روز داروی لتروزول با دوز 1mg/kg را دریافت نموده (مدل PCOS) و پس از آن ۲۰ میکرولیتر محیط کشت پایه به صورت موضعی به تخمدان‌ها تزریق شد (۹۴).

زیرگروه درمان با سلول بنیادی مزانشیمی چربی (PCOS-ASC): موش‌های صحرایی ۲۱ روز داروی لتروزول با دوز 1mg/kg را دریافت نموده (مدل PCOS) و پس از آن، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی 2×10^6 سلول زنده بنیادی مزانشیمی چربی، به صورت موضعی به تخمدان‌ها تزریق شد (۹۴، ۱۰۴).

زیر گروه درمان با محیط کشت بهینه شده ی حاصل از سلول بنیادی چربی (PCOS-ASC-CM): موش‌های صحرایی ۲۱ روز داروی لتروزول با دوز 1mg/kg را دریافت نموده (مدل PCOS) و پس از آن، ۲۰ میکرولیتر محیط کشت بهینه ی سلول بنیادی چربی به صورت موضعی به تخمدان‌ها تزریق شد (۹۴).



شکل ۳-۳: گروه‌های مورد مطالعه. CMC= carboxymethylcellulose و D=day.

۱۱-۳- آزمایشات مرتبط با آماده سازی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

۱۱-۳-۱- جدا سازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

بافت چربی تهیه شده با روش لیپوساکشن درلوله های استریل محتوی PBS^{28} ، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین^{۲۹} و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر استرپتومایسین^{۳۰} جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. بافت چربی چندین بار با محلول PBS حاوی ۱ درصد آنتی بیوتیک شسته شد و با آنزیم کلاژناز نوع ۱، (۰/۰۷۵ درصد) با حرکت مداوم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه هضم شد. در پایان زمان مقرر، کلاژناز با حجم مساوی از محیط کشت DMEMf12^{۳۱} به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)^{۳۲} خنثی گردید. سلول ها به وسیله سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه و دور ۳۰۰۰rpm از محلول جدا شدند. محلول رویی دور ریخته شده و مجدداً محیط کشت DMEMf12 به همراه ۱۰٪ FBS اضافه شده و مجدداً محلول سانتریفیوژ شد. نهایتاً با دور ریختن محلول رویی، رسوب سلولی در محیط کشت DMEMf12 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین درون فلاسک کشت گسترده شد؛ فلاسک های حاوی سلول به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و CO₂ ۵ درصد انتقال داده شدند. ۱۲ ساعت بعد به منظور حذف سلول های مرده و شناور، محیط کشت تعویض گردید. محیط کشت هر ۲ روز یکبار تعویض شد. در نهایت پس از پوشش هشتاد درصدی کف پلیت با سلول های استخراج شده، با استفاده از تریپسین^{۳۳} پاساژ یا انجماد سلولی انجام شد (۱۰۵). تمامی مراحل آزمایشات زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام شد. در این مطالعه سلول های پاساژ چهارم جهت تزریق مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۴-۳).

²⁸ Phosphate-buffered saline

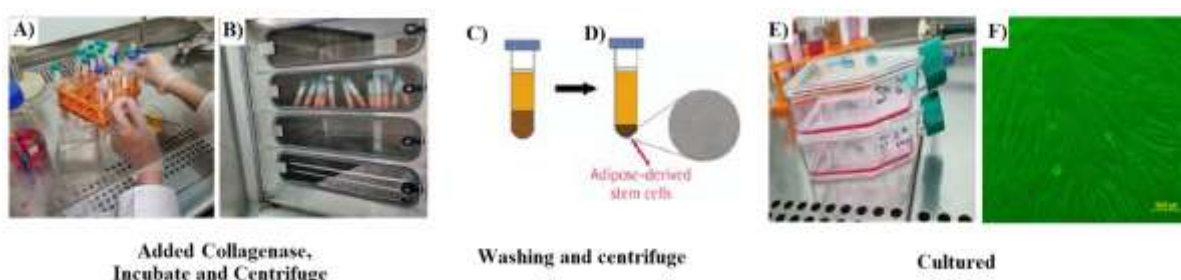
²⁹ Penicillin

³⁰ Streptomycin

³¹ Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F12

³² Fetal bovine serum

³³ Trypsin



شکل ۴-۳: مراحل استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسان (A-F).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (F) (پاساژ چهارم $\times 400$).

۲-۱۱-۳- پاساژ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

پاساژ سلولی در زمانی که پوشش و تراکم سلولی بیش از ۸۰ درصد رسید، انجام شد. برای این منظور، ابتدا محیط کشت فلاسک به طور کامل خارج و سپس فلاسک ۲ تا ۳ مرتبه با PBS شسته شد. پس از اضافه کردن تریپسین دو و نیم درصد (۱ میلی لیتر)، فلاسک به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد و سپس جهت اطمینان از جدا شدن کامل سلول‌ها، فلاسک مورد نظر در زیر میکروسکوپ مشاهده و بررسی شد. جهت خنثی سازی و غیر فعال کردن آنزیم تریپسین، ۲ میلی لیتر محیط کشت کامل اضافه گردید. سوسپانسیون موجود در فلاسک به داخل یک فالكون منتقل و با دور ۱۵۰۰ rpm و مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از خارج کردن تمامی مایع رویی، ۱ میلی لیتر محیط کشت به رسوب سلولی اضافه شد و محلول به آرامی پیپتاژ شد تا سوسپانسیون یکنواخت سلولی به دست آید. در نهایت سوسپانسیون سلولی به همراه حجم مورد نیاز از محیط کشت کامل (میزان ۵ میلی لیتر برای یک فلاسک ۲۵ سانتیمتر مربع) به فلاسک مورد نظر منتقل گردید. بعد از پاساژ سلول‌ها، محیط کشت فلاسک هر ۲ تا ۳ روز یک بار تعویض شد (۱۰۶، ۱۰۷).

۳-۱۱-۳- شمارش سلولی و آزمون حیات سلولی

ابتدا لامل مخصوص در قسمت میانی لام نئوبار قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر مخلوط سوسپانسیون سلولی و تریپان بلو ۰/۴ درصد به آرامی در حد فاصل لام و لامل قرار داده شد تا سطح لام را بپوشاند. برای

شمارش سلول‌ها، ابتدا تعداد کل سلول‌های ۴ مربع اطراف لام نئوبار شمارش شد و میانگین آن‌ها به دست آمد. سپس با استفاده از فرمول زیر، تعداد سلول‌ها در هر میلی لیتر محاسبه گردید:

$$\text{میانگین تعداد سلول‌های زنده در هر مربع} \times \text{ضریب رقت} \times 10^4 = \text{تعداد نهایی سلول‌ها}$$

لازم به ذکر است با توجه به این که ۱ برابر حجم سوسپانسیون سلولی، محلول تریپان بلو اضافه شده

بود، ضریب رقت ۲ می‌باشد (۱۰۸).

هم چنین برای محاسبه درصد سلول‌های زنده، تعداد سلول‌های زنده بر تعداد کل سلول‌ها تقسیم و

سپس در عدد ۱۰۰ ضرب شد. سلول‌هایی که با محلول تریپان بلو رنگ نشده بودند، به عنوان سلول‌های زنده

در نظر گرفته شدند (۱۰۹).

۴-۱۱-۳- انجماد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

با توجه به ارزشمند بودن رده ی سلولی و هم چنین ضرورت حفظ و ذخیره سلول‌ها در پاساژهای

سلولی پایین (۳ تا ۵)، گروهی از سلول‌ها بایستی طبق یک روش مشخص منجمد شده و برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شوند.

برای انجماد سلول‌ها ابتدا محلول انجماد سلولی آماده شد. این محلول دارای ۹۰ درصد FBS و ۱۰

درصد DMSO^{۳۴} می‌باشد (۱۱۰). یک میلیون سلول زنده در هر میلی لیتر محلول انجمادی مخلوط و در

کرایووئال‌های مختلف (یک سی سی در هر کرایووئال) تقسیم شدند. کرایووئال‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال

۴°C، ۲ ساعت در فریزر ۲۰°C- و یک شبانه روز در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند و در نهایت به نیتروژن مایع

موجود در تانک ازت (۱۹۶°C-) منتقل شدند.

۵-۱۱-۳- ذوب سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

برای ذوب سلول‌های منجمد از روش زیر استفاده شد.

³⁴ Dimethyl sulfoxide

۱. خارج کردن کرایوویال از تانک ازت و انتقال سریع آن به حمام آب گرم (37°C)
 ۲. حرکت دورانی کرایوویال در حمام آب گرم تا زمانی که محلول تقریباً به طور کامل ذوب شود و تنها مقدار کمی از یخ باقی مانده باشد.
 ۳. ضدعفونی کردن کرایوویال با اتانول ۷۰ درصد و انتقال آن به زیر هود لامینار
 ۴. انتقال محلول حاوی سلول به لوله سانتریفیوژی که از قبل آماده شده است و حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت کامل می باشد.
 ۵. سانتریفیوژ لوله حاوی محلول سلولی با دور ۲۰۰۰ rpm و مدت زمان ۲ دقیقه
 ۶. خالی کردن کل محیط رویی و افزودن ۲ سی سی محیط کشت کامل به آن
 ۷. پیپتاژ آرام محلول برای ایجاد یک سوسپانسیون یکنواخت سلولی
 ۸. شمارش سلول ها و بررسی زنده مانی سلول ها
 ۹. انتقال سلول ها به فلاسک های مورد نظر و قرار دادن آن ها در انکوباتور با ۵% CO_2 و دمای 37°C
- (۱۱۱).

۱۲-۳- نشانه گذاری سلول ها با رنگ فلوئورسنت PKH 26 قبل از پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی

مشتق از چربی

این روش برای رنگ آمیزی و نشانه گذاری غشای سلولی بکار می رود و برای این کار از کیت PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Cat number P 9691, Sigma, USA) استفاده و تمامی مراحل انجام کار طبق دستور العمل کیت مربوطه انجام شد. بدین منظور، پس از جداسازی سلول ها از کف فلاسک توسط آنزیم تریپسین، محیط کشت فاقد FBS به آن اضافه و سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ و برای مدت ۵ دقیقه انجام شد. مابعد رویی دور ریخته شد و سلول ها با محلول C موجود در کیت رقیق شدند. سپس رنگ فلوئورسنت PKH 26 به محلول حاوی سلول اضافه شد و فالكون حاوی سلول و رنگ به مدت ۷ دقیقه در انکوباتور با دمای 37°C انکوبه شد. سپس PBS را به محلول قبلی اضافه کرده و به سرعت عمل پیپتاژ انجام گرفت و سانتریفیوژ در دور

۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه انجام و مایع رویی خارج شد. پس از آن، ۱ تا ۲ سی سی محیط کشت کامل به محلول اضافه شد و سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه برای ۳ بار انجام گرفت. سپس سلول‌ها قبل از تزریق توسط میکروسکوپ فلوئورسنت بررسی شدند (۱۱۲).

۱۳-۳- تهیه محیط کشت بهینه از سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی (ASC-MSC) در پاساژ ۳ در فلاسک ۷۵ سانتیمتر مربع کشت داده شدند و زمانی که سلول‌ها ۸۰ درصد سطح فلاسک را پوشش دادند، محیط کشت آن‌ها تخلیه و پس از دو بار شستشو با بافر PBS، بر روی 1×10^6 سلول، ۱۲ میلی لیتر محیط کشت DMEM فاقد سرم ریخته شد. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت بهینه سلولی (ASC-MSC) جمع آوری گردید و پس از حذف خرده‌های سلولی و ذرات درشت موجود در آن، با استفاده از اولترافیلتراسیون با فیلترهای میلی پور 3KDa با سرعت ۷۵۰۰ rpm به میزان ۱۰ برابر تغلیظ شد و در دمای منفی ۸۰ ذخیره گردید (۶۳، ۱۱۳، ۱۱۴). سلول‌ها نیز در محیط انجمادی حاوی ۹۰ درصد سرم FBS و ۱۰ درصد دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxid, DMSO, Germany, Sigma) منجمد و در دمای منفی ۸۰ ذخیره شدند. در گروه درمان با محیط کشت بهینه ی حاصل از سلول بنیادی مزانشیمی چربی، ۲۰ میکرولیتر ASC-CM حاصل از 2×10^6 سلول به صورت موضعی به داخل تخمدان‌ها تزریق شد (۸۴، ۱۱۵).

۱۴-۳- پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و محیط کشت بهینه حاصل از آن

پس از القاء مدل و در روز ۲۱ ام پس از گاوآژ دهانی داروی القاء کننده ی سندروم تخمدان پلی کیستیک، ۴ سر موش در هر گروه (CMC و PCOS) با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شدند. موهای ناحیه ی سوپرا فلانک و زیر دنده ی دوازدهم آن‌ها با استفاده از تیغ مخصوص، تراشیده شد. ناحیه ی مذکور با استفاده از شان جراحی استریل محصور و محل برش با بتادین (پوویدون - آیودین) ضد عفونی شد. سپس برش کوچکی روی پوست و صفاق در هر دو طرف ایجاد و محل برش باز شد. تخمدان‌ها به آرامی و به دقت از

بدن حیوان بیرون آورده شدند و 2×10^6 سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی در $20 \mu l$ محیط کشت پایه معلق شده در گروه ASC و 20 میکرولیتر محیط کشت بهینه حاصل از ASC در گروه ASC-CM و در گروه‌های حامل و محیط به ترتیب 20 میکرولیتر نرمال سالین و محیط کشت پایه با استفاده از سرنگ انسولین به آرامی به داخل بافت تخمدان‌های حیوان تزریق شد (۹۴، ۱۰۴). پس از پیوند، تخمدان‌ها به داخل حفره شکم حیوانات برگردانده شدند و صفاق با استفاده از نخ بخیه کرومیک $4/0$ و پوست با نخ نایلون $4/0$ بخیه شد. سپس محل جراحی به پماد تتراسایکلین آغشته شد و حیوانات به داخل حیوان خانه جهت نگهداری به مدت ۴ هفته منتقل شدند (شکل ۵-۳).



شکل ۵-۳: مراحل پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و محیط کشت بهینه حاصل از آن، نرمال سالین و محیط کشت پایه به داخل بافت تخمدان (۱-۷).

۱۵-۳- اندازه‌گیری وزن بدن حیوانات

وزن بدن حیوانات قبل از شروع مطالعه و در روز نمونه‌گیری با ترازوی دیجیتال (صنایع پند، ایران) اندازه‌گیری شد. جهت انجام این کار ابتدا ترازو کالیبره شده و سپس موش‌ها توزین شدند (شکل ۶-۳).



شکل ۳-۶: اندازه گیری وزن بدن حیوانات با استفاده از ترازوی دیجیتالی.

۳-۱۶- اندازه گیری وزن رحم حیوانات

چهار هفته پس از پیوند در روز پایانی درمان و نیز موش های CMC در فاز دای استروس با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش و کشته شدند. شاخ رحم سمت چپ حیوان خارج و در پلیت حاوی PBS قرار داده شد. بادقت چربی و بافت همبند پیرامون رحم زیر میکروسکوپ استریو جدا، با کمک کاغذ صافی خشک شده و با ترازوی حساس الکتریکی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند. همچنین به منظور بررسی تغییرات مورفومتریک و هیستولوژیک، رحم چپ در محلول فیکساتیو فرمالدهید ۱۰٪ قرار داده و فیکس شد (۱۱۶).

۱۷-۳- ارزیابی سطح سرمی استرادیول

چهار هفته پس از درمان، خونگیری از بطن چپ حیوانات بیهوش شده در مرحله دی استروس (۸-۹ صبح) به منظور ارزیابی سطح سرمی ۱۷-بتا استرادیول انجام شد (۱۱۷). سپس نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده، سرم آن‌ها در میکروتیوپ‌های مربوط به هر نمونه جمع آوری شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه داری شدند. ۱۷-بتا استرادیول با استفاده از کیت تشخیصی هورمون مخصوص موش صحرایی (Monobind, Inc., U.S) و روش الیزا ارزیابی گردید.

۱۸-۳- رنگ آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین

رنگ آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین برای بررسی بافت شناسی شاخ رحمی چپ و نیز تخمدان چپ مورد استفاده قرار گرفت. پس از جمع آوری بافت رحم چپ و تخمدان چپ حیوانات و تثبیت در محلول فرمالین ۱۰ %، پردازش نمونه‌های بافتی جهت بررسی‌های بافت شناسی رحم و بررسی جسم زرد و کیست های تخمدانی جهت تایید القای PCOS، طبق الگوی زیر انجام شد. پاساژ بافتی شامل ۳ مرحله است. تمام مراحل به صورت اتوماتیک توسط دستگاه انجام شد.

الف) آگیری: در این مرحله بافت‌ها در محلول الکل با غلظت‌های متفاوت به ترتیب زیر قرار داده شدند:

جدول ۳-۳: مراحل آگیری بافت

نام ماده	مدت زمان
الکل ۷۰ %	یک ساعت
الکل ۸۰ %	یک ساعت
الکل ۹۶ %	(دو مرحله هر کدام به مدت یک ساعت)
الکل ۱۰۰ %	(دو مرحله هر کدام به مدت یک ساعت)

(ب) شفاف سازی: بافت‌ها در دو ظرف حاوی زایلین هر کدام به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند تا زایلین جایگزین الکل گردد و بافت شفاف شود.

(ج) جایگزینی: بافت‌ها در دو ظرف حاوی پارافین مذاب در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد هر کدام به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند تا پارافین در بافت نفوذ کند.

(د) قالب گیری: در این مرحله ابتدا بافت مورد نظر را با توجه به شکل و نوع بافت ته قالب آلومینیومی گذاشته و پارافین مذاب روی آن ریخته شد و در پایان برچسبی حاوی مشخصات بافت و گروه بر روی قالب چسبانده شد.

(ه) مقطع گیری: توسط میکروتوم دوار، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون با فاصله ۵۰ میکرون تهیه شد (۱۱۸). سپس هر کدام از مقاطع برای باز شدن چروکشان به حمام آب گرم با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند. در نهایت مقاطع با احتیاط بر روی لام‌هایی که از قبل مشخصات مقطع روی آن‌ها حک شده بود، قرار داده شدند. تمام لام‌ها برای حذف پارافین اضافی و آماده شدن برای رنگ آمیزی در فور قرار داده شدند (به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد).

۱۹-۳- شیوه انتخاب مقاطع برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین

به منظور رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، ۸ برش سریالی با ضخامت ۵ میکرون و فواصل منظم ۵۰ میکرومتری انتخاب و برداشته شد.

مقاطع بافتی با استفاده از هماتوکسیلین^{۳۵} و ائوزین^{۳۶} مطابق مراحل زیر رنگ آمیزی شدند:

^{۳۵} Hematoxiline

^{۳۶} Eosine

جدول ۴-۳: مراحل رنگ آمیزی بافت رحم با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انئوزین

نام ماده	مدت زمان
حذف پارافین و شفاف سازی قرار دادن لامها در زایلین	۱۰ دقیقه
آبدهی قرار دادن لامها در الکل با غلظتهای ۵۰، ۷۰، ۱۰۰٪	هر کدام ۱ دقیقه
شست و شو با آب جاری	۲ دقیقه
قرار دادن لامها در هماتوکسیلین	۲ دقیقه
شست و شو با آب جاری	۲ دقیقه
قرار دادن لامها در رنگ انئوزین	۲ دقیقه
شست و شو با آب جاری	۲ دقیقه
آبگیری با قرار دادن لامها در الکل با غلظتهای ۵۰، ۷۰، ۱۰۰٪	۳ ضربه
قرار دادن لامها در زایلین	۵ دقیقه
مونت کردن لامها با چسب انتیلان	-

پس از رنگ آمیزی H&E، لام های تخمدان و شاخ رحمی چپ موش های صحرایی کد گذاری شده و بدون آگاهی از گروه های آزمایش زیر میکروسکوپ نوری (Olympus IX51) بررسی شدند. افزایش تعداد کیست های تخمدانی و کاهش جسم زرد در بافت تخمدان تاییدکننده القای مدل می باشد.

1- کیست های تخمدانی شامل فضا های بزرگ پر از مایع و بدون تخمک

2- جسم زرد شامل توده سلول های رنگ پریده متمایل به سطح تخمدان

کیست های تخمدانی و اجسام زرد در لام های تهیه شده با میکروسکوپ نوری و با بزرگ نمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ بررسی شدند.

۳-۲۰- ارزیابی مورفومتریک و هیستولوژیک رحم

ابتدا لام های رنگ آمیزی شده توسط محقق دیگری بدون اطلاع آزمایش گر شماره گذاری شدند و سپس مقاطع رحمی برای ارزیابی پارامترهای پایین، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ x و ۲۰ x مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۷-۳ و ۸-۳):

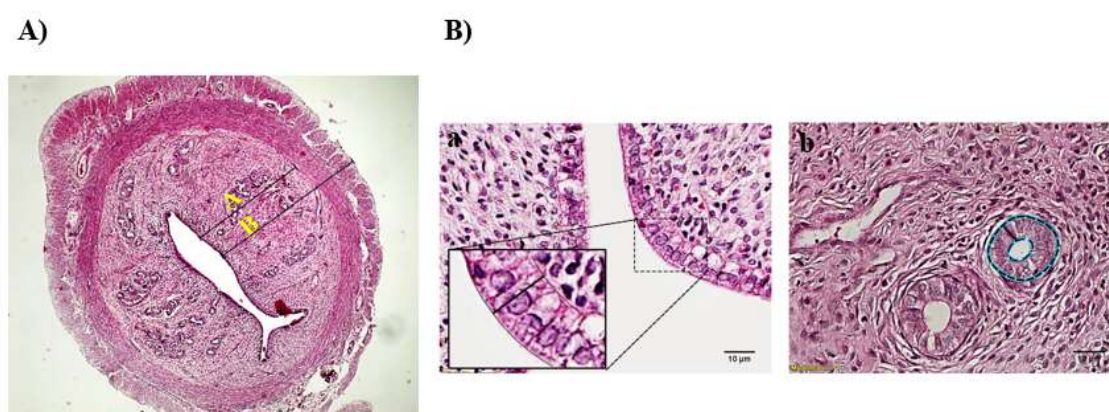
این پارامترها شامل ضخامت اندومتر، ضخامت کل دیواره رحم، ارتفاع سلول های اپی تلیال لومینال و ارتفاع سلول های اپی تلیال غدد رحمی است که با استفاده از نرم افزار image z توسط آزمایشگر اصلی- بدون اطلاع از نام گروهی که مورد بررسی قرار می گیرد- اندازه گیری شدند.

۱- **ضخامت اندومتر:** فاصله عمودی از محل اتصال اندومتر با میومتر تا حفره رحمی تعریف می شود (۱۱۹) (شکل ۷-۳. A).

۲- **ضخامت کل دیواره رحم:** فاصله عمودی از راس سلول های اپی تلیومی لومینال رحم تا پایان پریمتر می باشد (۱۱۹) (شکل ۷-۳. A).

۳- **ارتفاع سلول های اپی تلیال لومینال:** فاصله ی بین غشای پایه تا راس سلول های لومینال است (۱۲۰) (شکل ۸-۳. a).

۴- **ارتفاع سلول های اپی تلیال غدد رحمی:** فاصله ی بین غشای پایه تا راس سلول های اپی تلیالی غدد رحمی است (۱۲۰) (شکل ۷-۳. b).



شکل ۷-۳: ارزیابی هیستومورفومتری

A: ضخامت اندومتر (خط دو طرفه A)، ضخامت دیواره رحم (خط دو طرفه B). B: ارتفاع سلول های اپی تلیالی لومینال (خط نشان داده شده در شکل a)، ارتفاع سلول های اپی تلیالی (خط نشان داده شده در شکل b) غدد رحمی که غده با دایره آبی نشان داده شده است.

۲۱-۳- بررسی بیان پروتئین به روش وسترن بلاتینگ

به منظور مقایسه سطح پروتئین $ESR\alpha$ و $ESR\beta$ از روش وسترن بلاتینگ استفاده شد. در این روش، پروتئین‌های استخراج شده از سلول یا بافت بر اساس وزن مولکولی از طریق الکتروفورز روی ژل جدا شدند. سپس پروتئین‌های جدا شده به یک غشا منتقل شده و بعد غشا با آنتی بادی‌های مخصوص پروتئین مورد نظر انکوبه گردید. در پایان آشکارسازی باند و اندازه گیری آن صورت می‌گیرد (۱۲۱، ۱۲۲).

۱-۲۱-۳- استخراج پروتئین از بافت رحم

وسایل مورد نیاز برای استخراج پروتئین از بافت رحم

۱. میکروتیوب
 ۲. سمپلر
 ۳. سرسمپلر
 ۴. سونیکاتور
 ۵. سانتریفیوژ یخچال دار
- مواد مورد نیاز برای استخراج پروتئین از بافت رحم
۱. یخ
 ۲. بافر RIPA^{۳۷}
 ۳. آنتی پروتئاز

همه مراحل استخراج پروتئین روی یخ انجام شد تا اثر پروتئازها به حداقل برسد. ۴۰ میلی گرم بافت رحم سمت راست هر حیوان به میکروتیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر RIPA و ۱۰ میکرولیتر آنتی پروتئاز افزوده و توسط دستگاه سونیکاتور روی یخ هموژن شد. سپس میکروتیوب‌های حاوی بافت هموژن شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. مایع رویی که حاوی پروتئین-

³⁷Radioimmunoprecipitation Assay Buffer

های استخراج شده از بافت رحم بود در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری به میکروتیوب‌های جداگانه انتقال یافت و تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲-۲۱-۳- بافرها و محلول‌های مورد استفاده برای انجام وسترن بلاتینگ

مواد مورد نیاز برای تهیه بافرها و محلول‌های وسترن بلاتینگ:

- | | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| ۱. تریس باز | ۷. برموفنول بلو |
| ۲. آکریل آمید | ۸. پرسولفات آمونیوم (APS) |
| ۳. بیس آکریل آمید | ۹. گلیسین |
| ۴. کلرید سدیم | ۱۰. گلیسرول |
| ۵. سدیم دو دسیل سولفات (SDS) | ۱۱. متانول |
| ۶. مرکاپتواتانول | ۱۲. شیر خشک بدون چربی (Skim milk) |

۳-۲۱-۳- بافر ژل پایین

۱۸/۲ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل و pH بافر با اسید کلریدریک روی ۸/۸ تنظیم شد و سپس حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۴-۲۱-۳- بافر ژل بالا

۶/۱ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل و pH بافر با اسید کلریدریک روی ۸/۶ تنظیم شد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۵-۲۱-۳- بافر الکتروفورز (Running buffer 1X)

ابتدا ۳ گرم تریس باز و ۱۴/۴ گرم گلیسین در ۸۰۰ میلی لیتر آب حل گردید. سپس ۱ گرم SDS به محلول افزوده و حل شد. pH این بافر معمولاً در محدوده ۸/۵-۸/۳ قرار داشت. در غیر این صورت، pH با اسید کلریدریک در این محدوده تنظیم می شد. در انتها، حجم بافر با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد.

۶-۲۱-۳- بافر نمونه (Loading or Sample buffer 5X):

ابتدا ۱۰ میلی لیتر بافر ژل بالا و ۵ میلی لیتر گلیسرول با هم مخلوط شدند. سپس ۱ گرم SDS به محلول افزوده و حل گردید. ۰/۵ میلی لیتر محلول برموفنل بلو (۱/۰ درصد در اتانول) و ۱ میلی لیتر ۲-مرکاپتواتانول نیز به محلول اضافه و در انتها حجم بافر با آب مقطر به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد.

۷-۲۱-۳- بافر انتقال (Transfer buffer)

ابتدا ۳ گرم تریس باز و ۱۴/۴ گرم گلیسین در ۶۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس ۱۵۰ میلی لیتر متانول به محلول افزوده شد و پس از تنظیم pH بافر روی ۸/۴ بوسیله اسید کلریدریک، حجم بافر با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد. این بافر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

۸-۲۱-۳- بافر TBS (10X)

۱۲/۱ گرم تریس باز و ۸۷/۷ گرم کلرید سدیم در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به حجم ۱ لیتر رسانده شد. هنگام استفاده از بافر، ۰/۵ میلی لیتر Tween-20 به ۱۰۰ میلی لیتر از بافر افزوده و pH بافر بوسیله اسید کلریدریک روی ۷/۵ تنظیم گردید. سپس حجم بافر با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد. به این ترتیب، بافر TBST (1X) از بافر TBS (10X) ساخته شد.

۹-۲۱-۳- بافر مسدود کننده (Blocking buffer)

۵ گرم شیر خشک بدون چربی (Skim milk) در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBST حل گردید.

۱۰-۲۱-۳- محلول استوک آکريل آميد (۳۰/۸ درصد)

۳۰ گرم آکريل آميد و ۰/۸ گرم بیس آکريل آميد در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آرامی حل گردید و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. این محلول با کاغذ صافی واتمن صاف و در ظرف تیره در یخچال نگهداری شد.

۱۱-۲۱-۳- محلول پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد

۰/۱ گرم پرسولفات آمونیوم ۳۸ در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. این محلول بایستی تازه ساخته شود.

۱۲-۲۱-۳- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد

از جمله روش‌های تعیین غلظت پروتئین روش برادفورد است که اساس آن تفاوت در جذب نور در طول موج ۶۳۰ نانومتر در دستگاه است. با افزایش غلظت پروتئین محلول، رنگ آبی حاصل بیشتر شده و میزان جذب نوری آن افزایش می‌یابد. مواد لازم برای درست کردن محلول برادفورد در جدول ۳-۸ آمده است. برای ساخت محلول برادفورد ابتدا کوماسی بلو به مدت ۲۰ دقیقه در الکل حل می‌شود و سپس اسید فسفوریک قطره قطره به آن افزوده می‌شود. سپس آب را قطره قطره اضافه می‌کنیم تا محلول حاصل به حجم ۵۰ میلی لیتر برسد. محلول تهیه شده با کاغذ صافی دو بار صاف شده و در بطری تیره داخل یخچال نگهداری می‌شود (۱۲۲).

³⁸ Ammonium persulfate

جدول ۵-۳: ترکیبات لازم برای ساخت محلول برادفورد

Coomassie Blue G-250	5 mg
Ethanol 95%	2.5 mg
Phosphoric acid	5 mg
Distilled Water	Up to 50 ml

۱۳-۲۱-۳- تهیه غلظت‌های مختلف BSA برای کشیدن منحنی استاندارد

از BSA به عنوان پروتئین استاندارد برای اندازه گیری میزان پروتئین استفاده می‌شود. غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین استاندارد با افزودن نصف حجم آب به غلظت قبلی ایجاد شد. از جذب نوری میانگین هر غلظت برای کشیدن منحنی استاندارد که جذب نوری پروتئینی با غلظت‌های مشخص را نشان می‌دهد، استفاده می‌شود. نمونه‌ها نیز هرکدام به مقدار ۲۵ میکرو لیتر با ۳ تکرار در چاهک‌ها ریخته می‌شود. در نهایت در چاهک‌ها ۲۰۰ میکرو لیتر محلول برادفورد ریخته می‌شود و واکنش محلول برادفورد با پروتئین باعث ایجاد رنگ آبی می‌شود. سپس پلیت را در دستگاه الیزا ریدر قرار داده و جذب نوری OD آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر برای هر چاهک خوانده می‌شود. برای به دست آوردن غلظت پروتئین مورد نظر منحنی استاندارد را از جذب نوری BSA با غلظت‌های معین و با استفاده از نرم افزار Excel رسم کرده و با به دست آوردن معادله شیب خط نمودار، غلظت پروتئین مورد نظر با توجه به جذب نوری آن بر حسب mg/ml محاسبه می‌شود (۱۲۳).

غلظت‌های پروتئین، آب و بافر نمونه

به وسیله میانگین داده‌های برادفورد هر نمونه و همچنین داده‌های بالا و پایین منحنی استاندارد، غلظت پروتئین و متعاقب آن آب و بافر نمونه برای ساخت نمونه تعیین شد.

۱۴-۲۱-۳- الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)^{۳۹}

وسایل مورد نیاز برای انجام SDS-PAGE

۱. سیستم الکتروفورز عمودی
۲. صفحات شیشه‌ای مخصوص ساخت ژل
۳. شانه برای ایجاد چاهک در ژل
۴. سمپلر
۵. سر سمپلر

مواد مورد نیاز برای انجام SDS-PAGE

۱. محلول ژل پائین
۲. محلول ژل بالا
۳. ایزوپروپانول
۴. بافر نمونه
۵. بافر الکتروفورز

۱۵-۲۱-۳- روش SDS-PAGE و نحوه انجام آن

در این مطالعه، جداسازی اجزا پروتئینی در لیزات بافت تخمدان به روش الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید انجام شد. روش SDS-PAGE شامل دنا توره کردن پروتئین‌ها با استفاده از دترجنت آنیونی SDS و استفاده از جریان الکتریکی برای جداسازی پروتئین‌ها بر روی ژل پلی آکریل آمید است که این فرآیند، الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید نامیده می‌شود. SDS با تمایل بسیار زیادی به پروتئین‌ها متصل می‌شود و به صورت یکنواخت سطح پروتئین‌ها را با بار منفی می‌پوشاند. بنابراین، در SDS-PAGE پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی جدا می‌شوند به این صورت که، هر چه اندازه پروتئین کوچکتر باشد، سریع تر از منافذ ژل عبور می‌کند. ژل پلی آکریل آمید از پلیمریزاسیون مونومرهای آکریل آمید با مونومرهای بیس آکریل آمید که در ایجاد

³⁹Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

اتصالات عرضی نقش دارند، حاصل می‌شود. پلیمریزاسیون ژل با افزودن پرسولفات آمونیوم آغاز و با افزودن TEMED^{۴۰} تسریع می‌گردد (۱۲۴).

جهت انجام الکتروفورز از سیستم الکتروفورز عمودی استفاده گردید. برای انجام کار، ابتدا صفحات شیشه ای با اتانول ۷۰ درصد شسته شد و در مجاورت هوا خشک گردید. سپس صفحات شیشه‌ای بر روی پایه مخصوص قرار گرفتند. با قرار دادن دو صفحه شیشه ای بر روی یکدیگر، که یکی دارای نوار فضا دهنده (Spacer) در سه ضلع است، فضایی به اندازه ۱ میلی متر برای ریختن ژل ایجاد گردید. پس از درزگیری (Sealing) شیشه‌ها، ژل پایین یا جدا کننده (Resolving) با غلظت ۱۲/۵ درصد مطابق با جدول ۳-۹ ساخته و بین صفحات شیشه‌ای ریخته شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول روی آن ریخته و سطح ژل پوشانده شد. پس از ۴۵ دقیقه و اطمینان از سفت شدن ژل، ایزوپروپانول تخلیه و سطح ژل با آب مقطر شستشو داده شد. سپس محلول ژل بالا یا متراکم کننده (Stacking) با غلظت ۵ درصد (جدول ۳-۱۰) بر روی ژل پایین ریخته شد و شانه مخصوص در جایگاه مناسب بالای ژل قرار گرفت. پس از ۴۵ دقیقه و اطمینان از سفت شدن ژل بالا، شانه را برداشته و چاهک‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند.

جدول ۳-۶: مواد تشکیل دهنده ژل پایین (۱۲/۵ درصد)

مواد	مقدار (میکرولیتر)
بافر ژل پایین	۱۰۰۰
استوک آکریل آمید (۳۰/۸ درصد)	۱۶۳۰
آب مقطر	۱۳۶۰
APS (۱۰ درصد)	۲۰
TEMED	۶

⁴⁰Tetramethylethylenediamine

جدول ۷-۳: مواد تشکیل دهنده ژل بالا (۵ درصد)

مواد	مقدار (میکرولیتر)
بافر ژل بالا	۶۲۵
استوک آکریل آمید (۳۰/۸ درصد)	۴۰۵
آب مقطر	۱۴۵۰
APS (۱۰ درصد)	۲۵
TEMED	۷/۵

۱۰ میکروگرم از هر نمونه پروتئینی همراه با بافر نمونه (۴:۱) در یک میکروتیوب مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس مارکر پروتئینی و نمونه‌ها در چاهک‌های ژل بالا ریخته شد و ژل همراه با صفحات احاطه کننده در تانک الکتروفورز قرار گرفت. به داخل تانک، بافر الکتروفورز افزوده و الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت تا زمانی که رنگ به ابتدای ژل پایین برسد انجام شد. سپس ولتاژ به ۱۰۰ ولت افزایش یافت و الکتروفورز به مدت ۱/۵ ساعت انجام گرفت.

۱۶-۲۱-۳- انتقال باندها (بلاتینگ)^{۴۱}

وسایل مورد نیاز برای بلاتینگ

۱. کاغذ پلی وینیلیدن دی فلوراید (PVDF)^{۴۲} ۳. یخ

۲. تانک الکتروبلاتینگ

مواد مورد نیاز برای بلاتینگ

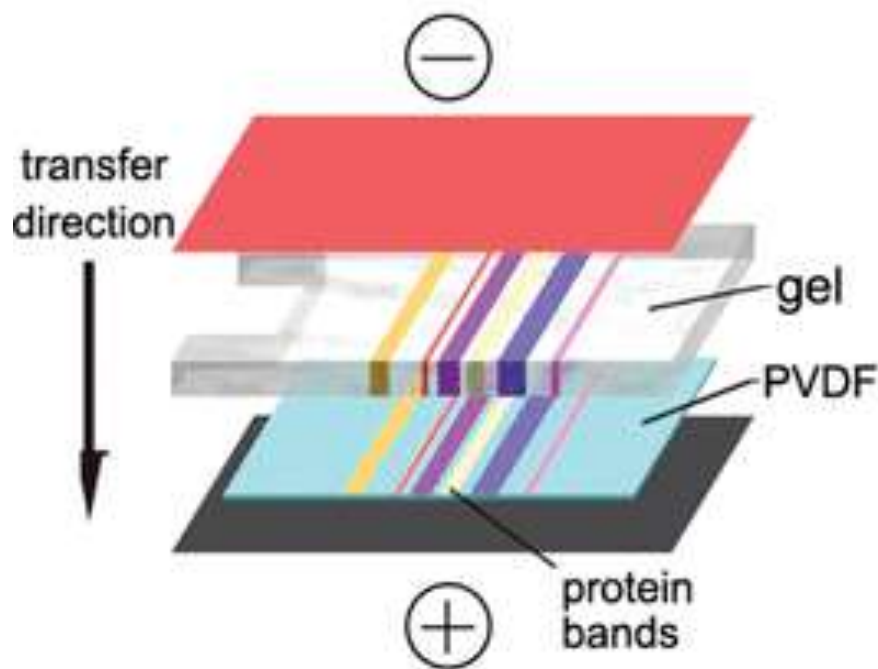
۱. متانول

۲. بافر ترانسفر

^{۴۱} Blotting

^{۴۲} Polyvinylidene difluoride

پس از پایان یافتن الکتروفورز، پروتئین‌ها باید از ژل به روی کاغذ PVDF منتقل می‌شدند. برای این منظور، کاغذ PVDF به اندازه ژل پایین بریده شد و برای فعال سازی آن، کاغذ به مدت ۲۰ ثانیه در متانول، ۱ دقیقه در آب مقطر و سپس ۵ دقیقه در بافر ترانسفر قرار گرفت. سپس ژل و کاغذ PVDF بین لایه‌های اسفنج، کاغذ صافی و صفحات مشبک دستگاه مانند شکل ۸-۳ ساندویچ شد. ساندویچ ترانسفر داخل تانک و تانک الکتروبلاتینگ در ظرف حاوی یخ قرار گرفت. بافر ترانسفر از یخچال خارج و داخل تانک ریخته شد. ترانسفر در ۲۲۰ میلی‌آمپر و به مدت ۱/۵ ساعت انجام گرفت. وجود مارکر پروتئینی بر روی کاغذ PVDF نشان دهنده انتقال پروتئین‌ها به کاغذ بود. با این وجود، برای اطمینان از انتقال پروتئین‌ها به کاغذ، کاغذ PVDF با محلول پانسو S (۰/۲ درصد) رنگ آمیزی شد که پس از شستشوی رنگ اضافی با آب مقطر، باندهای پروتئین مشاهده گردیدند. پس از اطمینان از ترانسفر، کاغذ PVDF به مدت ۱۵ ثانیه در متانول و سپس ۲ دقیقه در آب مقطر قرار داده شد.



شکل ۸-۳: نحوه قرار گرفتن ژل و کاغذ PVDF بین صفحات کاغذ صافی و قطب‌های مثبت و منفی

(۱۲۵).

۱۷-۲۱-۳- مسدود کردن کاغذ PVDF

به منظور مسدود کردن (بلاکینگ)^{۴۳} جایگاه‌های اتصال غیراختصاصی کاغذ PVDF، کاغذ در طول شب در بافر مسدود کننده و در یخچال قرار داده شد.

۱۸-۲۱-۳- اتصال آنتی بادی‌ها و شناسایی باندها

وسایل لازم برای اتصال آنتی بادی‌ها و شناسایی باندها

۱. شیکر ۳. کاست

۲. فیلم عکاسی

مواد لازم برای اتصال آنتی بادی‌ها و شناسایی باندها

۱. آنتی بادی اولیه اختصاصی پروتئین هدف ۳. بافر TBST

۲. آنتی بادی ثانویه کونژوگه با HRP ۴. محلول‌های ظهور و ثبوت

۱-۱۸-۲۱-۳- روش انجام کار

صبح روز بعد از انجام بلاکینگ، کاغذ PVDF چهار بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط بافر TBST بر روی شیکر و در دمای اتاق شستشو داده شد. سپس کاغذ PVDF با آنتی بادی اولیه اختصاصی پروتئین هدف بر روی شیکر در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. جهت رقیق سازی آنتی بادی‌ها از مخلوط بافر TBS و TBST (۱:۱) استفاده گردید. (جدول ۳-۱۱). سپس کاغذ PVDF چهار بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط بافر TBST شستشو داده شد. در مرحله بعد، انکوباسیون کاغذ PVDF با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با HRP بر روی شیکر و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. لازم به ذکر است که آنتی بادی ثانویه هم با رقت ۱:۱۰۰۰ در مخلوط بافر TBS و TBST (۱:۱) تهیه شد. سپس کاغذ PVDF چهار بار و هر بار به مدت ۵

⁴³Blocking

دقیقه با بافر TBST شستشو داده شد. ادامه مراحل در تاریک خانه انجام گرفت. ابتدا گوشه پایین کاغذ PVDF به دستمال کاغذی تماس داده شد تا بافر از روی آن خارج گردد. سپس کاغذ PVDF داخل یک کیسه پلاستیکی کاملاً شفاف قرار گرفت و ۴۰۰ میکرولیتر از سوبسترای ECL^{۴۴} بر روی کاغذ ریخته شد. پس از پوشاندن کاغذ PVDF با ورقه پلاستیکی، یک ورقه فیلم عکاسی به اندازه مناسب بر روی کاغذ PVDF قرار گرفت. پس از ۳۰ ثانیه، فیلم از روی PVDF برداشته و به ترتیب در محلول ظهور، آب مقطر، محلول ثبوت و آب مقطر قرار داده شد. پس از خشک شدن فیلم، باندهای پروتئینی ظاهر شده بر روی فیلم اسکن و بوسیله نرم افزار Image J، دانسیته باندها مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۸-۳: رقت آنتی بادی‌های اولیه مورد استفاده

رقت	آنتی بادی
۱:۳۰۰	ESR α
۱:۳۰۰	ESR β
۱:۳۰۰	β -Actin

۳-۲۲- ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر، پس از تصویب پروپوزال و تأیید کمیته اخلاق با کد IR.KMU.AEC.1402.064 انجام شد. تمامی مطالعات حیوانی، طبق استانداردها و قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید.

۳-۲۳- آنالیزهای آماری

در این مطالعه، یافته‌ها با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism 8 مورد تحلیل قرار گرفت. در ابتدا به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها، از تست one-sample Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و سپس داده‌های دارای توزیع نرمال با One-way ANOVA و Repeated Measure ANOVA (جهت بررسی

⁴⁴Enhanced chemiluminescence

تغییرات وزن و قندخون در طول زمان) با آزمون تعقیبی Tukey و داده‌های با توزیع غیر نرمال با تست Non parametric Kruskal-Wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقادیر $P \leq 0.05$ برای تعیین سطح معنی دار بودن اختلافات بین گروه‌ها در نظر گرفته شد. داده‌های کمی به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شد.

فصل چہارم

یافتہ ها

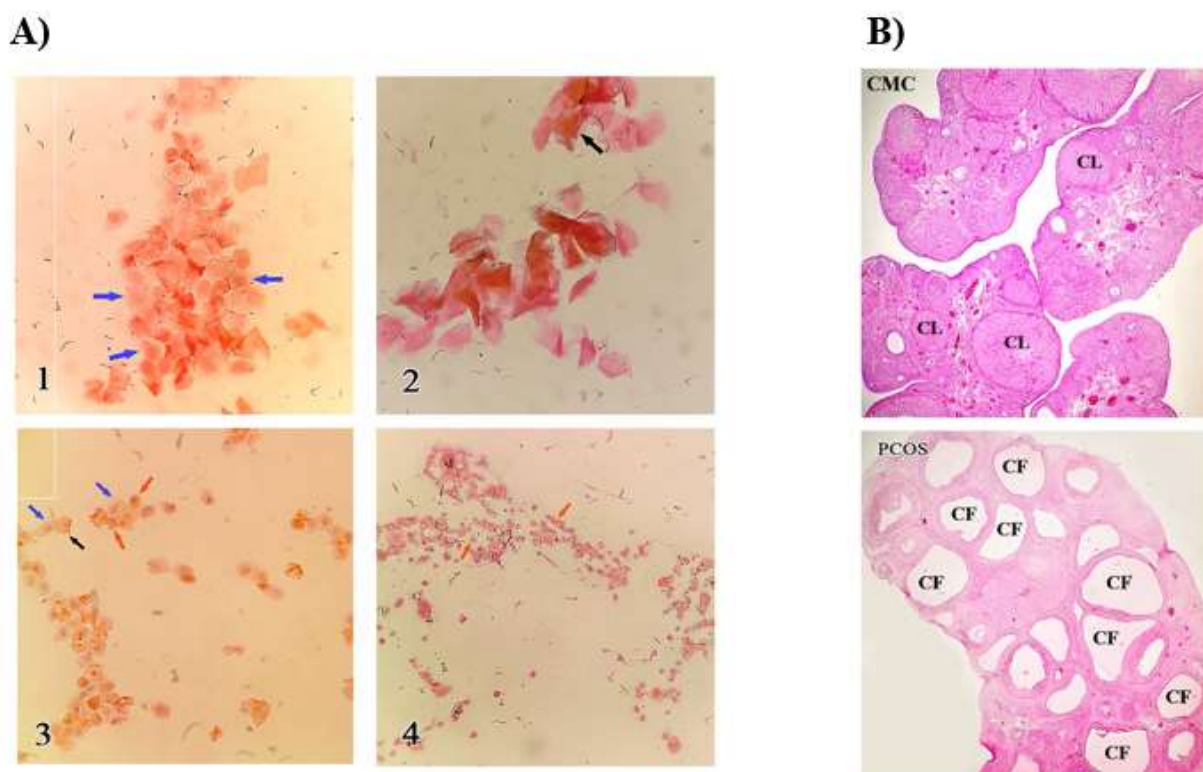
۱-۴- مقدمه

در این بخش، یافته‌های پژوهش در ۹ قسمت شامل تایید مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک، تایید و تشخیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، نتایج مطالعات مورفومتریک و بافت شناسی رحم، بررسی سطح سرمی هورمون جنسی و نیز بررسی سطح بیان پروتئین گیرنده های استروژنی با تکنیک وسترن بلات ارائه شده است.

۲-۴- تایید القای مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک

به منظور تایید القا مدل این سندروم، نظم چرخه استروس و نیز وضعیت بافت تخمدان از نظر ظاهر کیستیک و تعداد جسم زرد بعد از ۲۱ روز مصرف خوراکی لتروزول بررسی شد.

ارزیابی چرخه فحلی نشان داد که همه حیوانات در گروه CMC یک چرخه فحلی منظم در ۴ فاز متوالی داشتند (شکل ۱-۴. A)، در حالی که موش‌های تیمار شده با لتروزول توقف چرخه فحلی را در فاز دی استروس نشان دادند. همچنین، ارزیابی بافت تخمدان در گروه CMC، فولیکول‌های مختلف در حال رشد و فولیکول‌های قبل از تخمک‌گذاری را با تعداد زیادی جسم زرد بدون کیست نشان داد، در حالی که تخمدان حیوانات در گروه PCOS وجود چندین کیست بدون جسم زرد را نشان داد. این تغییرات القای PCOS را به درستی تایید کرد (شکل ۱-۴. B).



شکل ۱-۴: تایید مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک.

A: چرخه فحلی که در حیوانات CMC طبیعی و شامل ۴ فاز بود: ۱. فاز پرو استروس که عمدتاً توسط

سلول های اپیتلیال مشخص می شود (فلش آبی)، ۲. فاز فحلی که عمدتاً با کراتینوسیت ها (فلش سیاه)، ۳.

فاز مت استروس که با سلول های اپیتلیال، کراتینوسیت ها و لکوسیت ها (فلش قرمز) مشخص می شود و ۴.

فاز دی استروس که با تعداد زیادی لکوسیت مشخص می شود (رنگ آمیزی پاپانیکولاو، بزرگنمایی x400). B:

فتومیکروگراف های مقطع تخمدان. گروه CMC ظاهر بافت شناسی طبیعی تخمدان با چندین جسم زرد

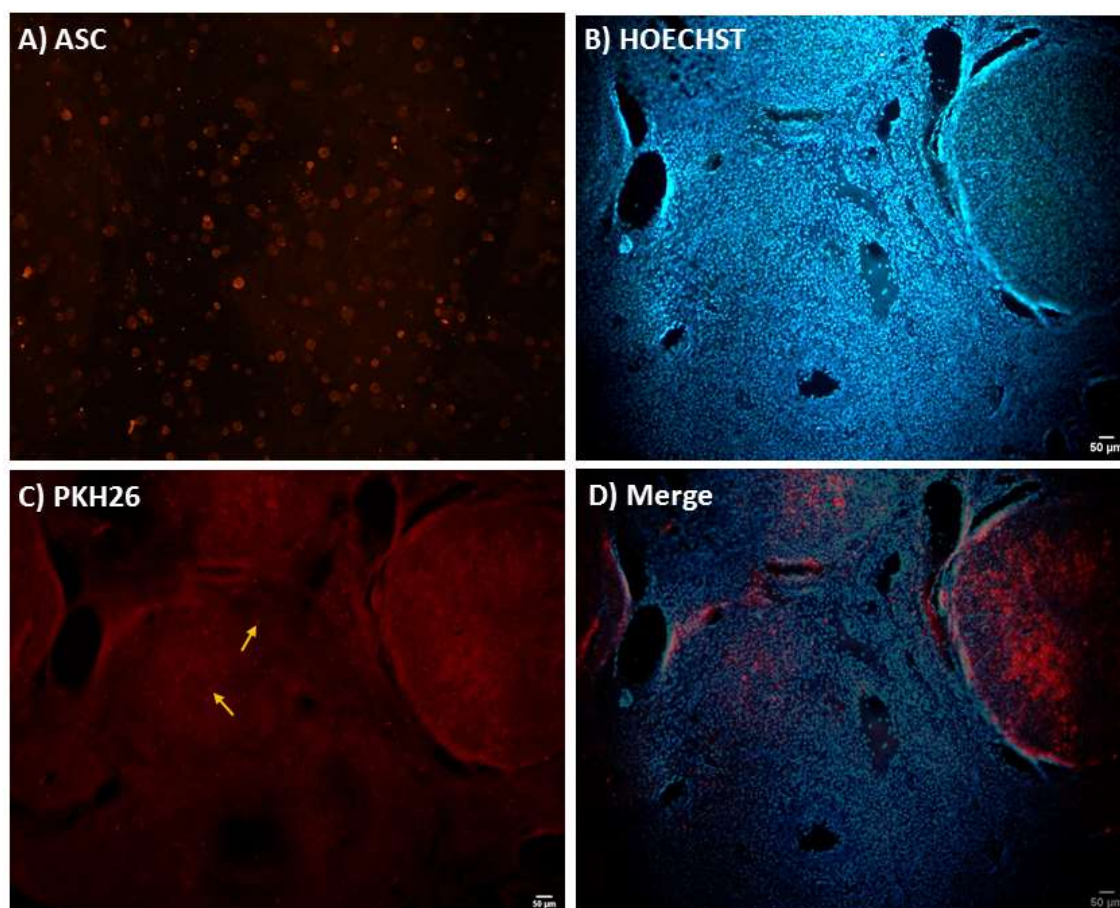
(CL) و فولیکول های سالم را داشت در حالی که تخمدان گروه PCOS دارای تعداد زیادی فولیکول های

کیستیک (CF) بدون جسم زرد داشتند (رنگ آمیزی H&E). چرخه فحلی (رنگ آمیزی

هماتوکسیلین/ائوزین)

۳-۴- تایید و تشخیص پیوند ASCs نشانه گذاری شده با PKH26 در تخمدان ها

به منظور بررسی محل قرارگیری ASCs پس از تزریق داخل تخمدانی، سلول ها ابتدا با رنگ فلورسنت PKH26 (Cat number P 9691, Sigma, USA) رنگ آمیزی شده و سپس به حیوانات تزریق شدند. چهار هفته پس از درمان، پس از جمع آوری بافت تخمدان، به منظور نمایان شدن هسته‌ی سلول ها، مقاطع بافت تخمدانی با رنگ هوخست (Cat number 23491-45-4, Sigma, USA) رنگ آمیزی شدند. با بررسی مقاطع بافتی زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد که هسته‌ی تمام سلول ها به رنگ آبی (نقاط آبی) و نقاط قرمز نشان دهنده ASCs نشاندار شده با رنگ فلورسنت غشایی است (شکل ۲-۴).



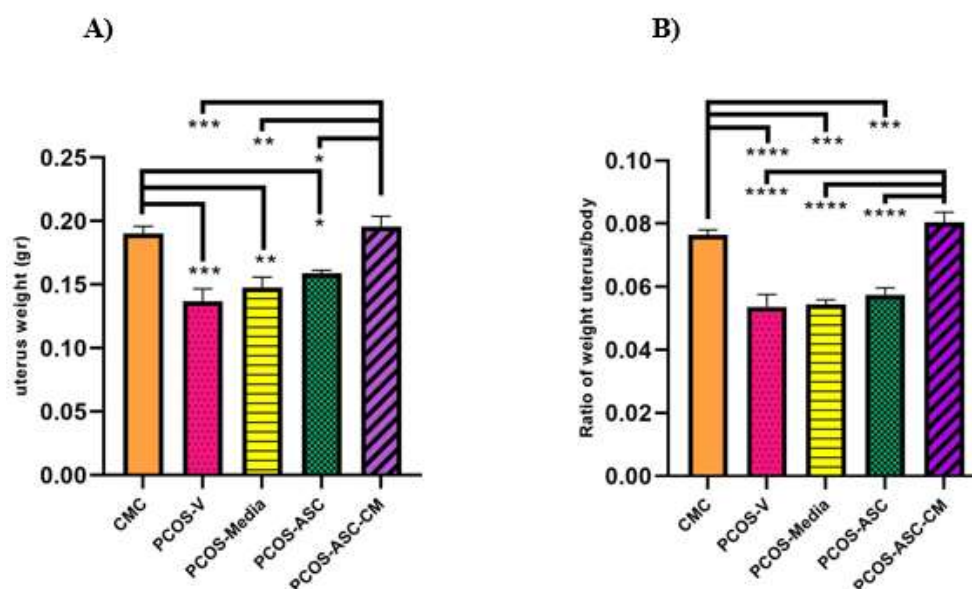
شکل ۲-۴: تایید و تشخیص پیوند ASCs نشانه گذاری شده با PKH26 در تخمدان ها.

(A) ASCs نشانه گذاری شده با رنگ فلورسنت غشایی PKH26 (نقاط قرمز) روی لام. (B) مقطع تخمدان رنگ آمیزی شده با رنگ فلورسنت هوخست به منظور نمایان شدن هسته سلول ها (نقاط آبی). (C)

ASCs نشانه گذاری شده با رنگ فلورسنت غشایی PKH26 (نقاط قرمز) در مقطع بافت تخمدان که با فلش زرد رنگ نشان داده شده است. (D) ادغام شده. بزرگنمایی $\times 100$.

۴-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر وزن رحم

وزن رحم و نسبت آن به وزن بدن به ترتیب کاهش معنی داری را در گروه های PCOS-V ($P=0.0004$), PCOS-Media ($P=0.0001$, $P=0.004$) و PCOS-ASC ($P=0.0000$) نسبت به گروه CMC نشان دادند. همچنین مقایسه گروه های درمانی نشان داد که پیوند CM مشتق شده از ASC می تواند این پارامترها را در گروه PCOS-ASC نسبت به گروه های PCOS-V ($P=0.0001$, $P=0.0000$), PCOS-Media ($P=0.0001$, $P=0.0000$) و PCOS-ASC ($P=0.01$, $P=0.0000$) به طور قابل توجهی افزایش دهد. با این حال، وزن رحم و نسبت آن به وزن بدن در گروه PCOS-ASC در مقایسه با گروه CMC به طور معناداری کمتر بود (به ترتیب $P=0.04$ و $P=0.0006$) (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴: تاثیر پیوند تخمدانی ASC و ASC-CM به مدل موش PCOS بر وزن رحم (A) و نسبت وزن رحم به بدن (B).

*, **, *** و **** به ترتیب تفاوت معنی داری را در $P=0.05$, $P=0.001$, $P=0.0001$ و $P=0.0000$ نشان می دهند.

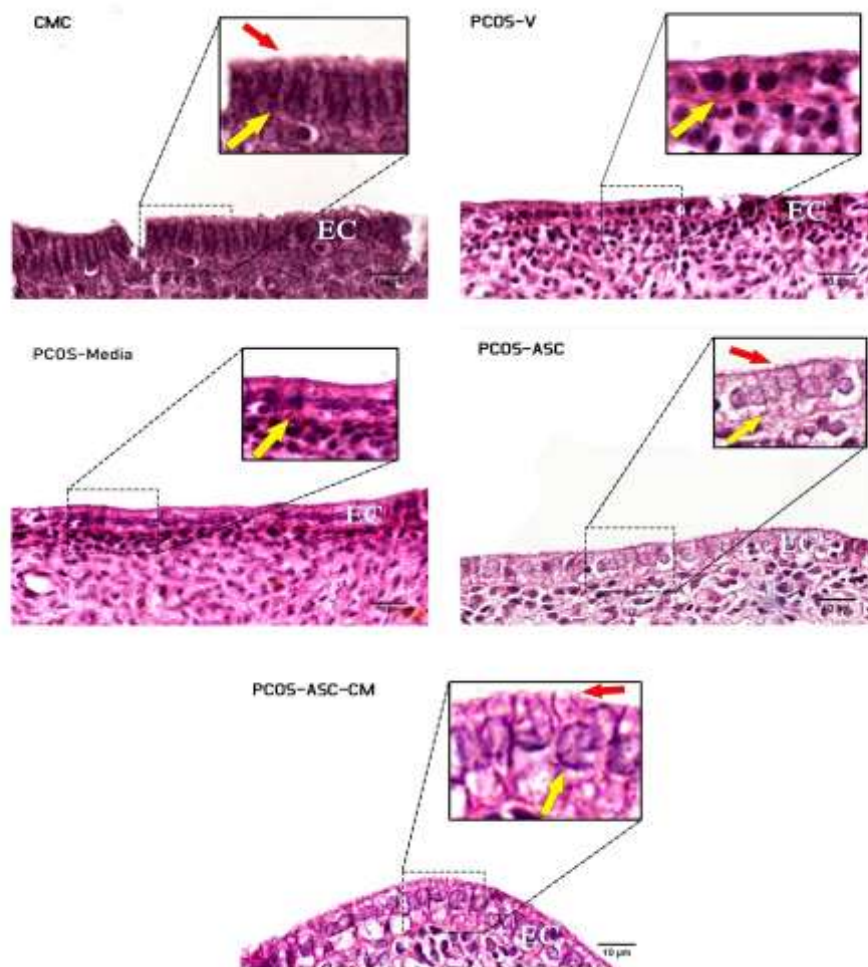
۵-۴- پارامترهای بافت شناسی رحم

نتایج نشان داد که سلول های اپیتلیال مجرا (LEC^{45}) رحم در گروه CMC استوانه ای بلند با هسته های کشیده و مژک های فراوان است. در مقابل، LEC در حیوانات گروه PCOS-V و PCOS-Media باریک تر بوده و دارای اپی تلیوم استوانه ای کوتاه با هسته های گسترده و تقریباً آپوپتوتیک داشتند. با این حال، مورفولوژی LEC در گروه PCOS-ASC-CM استوانه ای بلند بود. همچنین گروه PCOS-ASC تغییرات مثبت قابل توجهی در اپیتلیوم مجرا نشان نداد، به طوری که در این گروه سلول های استوانه ای کوتاه مشاهده می شد (شکل ۴-۴).

علاوه بر این، سلول های اپیتلیال غده ای (GEC^{46}) در موش های CMC مکعبی و دارای سیتوپلاسم کم رنگ با هسته های بزرگ بودند، در حالی که در گروه های PCOS-V و PCOS-Media، بسیاری از سلول ها از مکعبی به حالت سنگفرشی تغییر یافتند. به هر حال در گروه ASC و ASC-CM، شکل سلول های اپیتلیال غددی مانند گروه CMC به صورت مکعبی بود (شکل ۴/۵). همچنین تعداد غدد در گروه CMC و PCOS-ASC-CM نسبت به گروه های PCOS-V، PCOS-Media و PCOS-ASC بسیار بیشتر بود. قابل ذکر است که لومن غدد در گروه CMC فاقد سلول های التهابی خونی بود در حالی که نوتروفیل و لنفوسیت در گروه PCOS-V و PCOS-Media، به تعداد در داخل لومن غدد مشاهده شدند و در گروه های درمانی ASC و ASC-CM به صورت پراکنده و کمتری حضور داشتند (شکل ۴-۴).

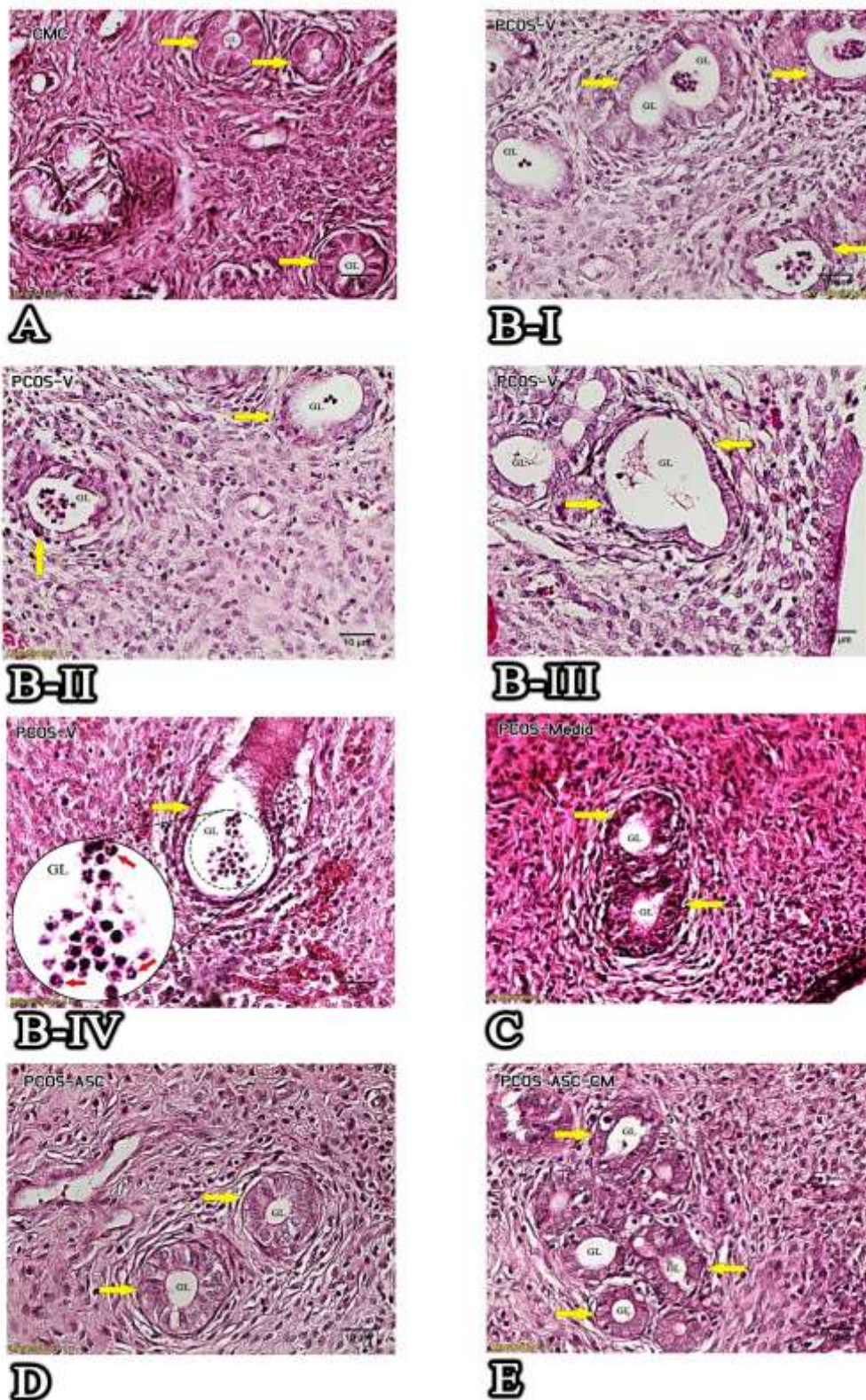
⁴⁵ Luminal epithelial cell

⁴⁶ Glandular epithelial cell



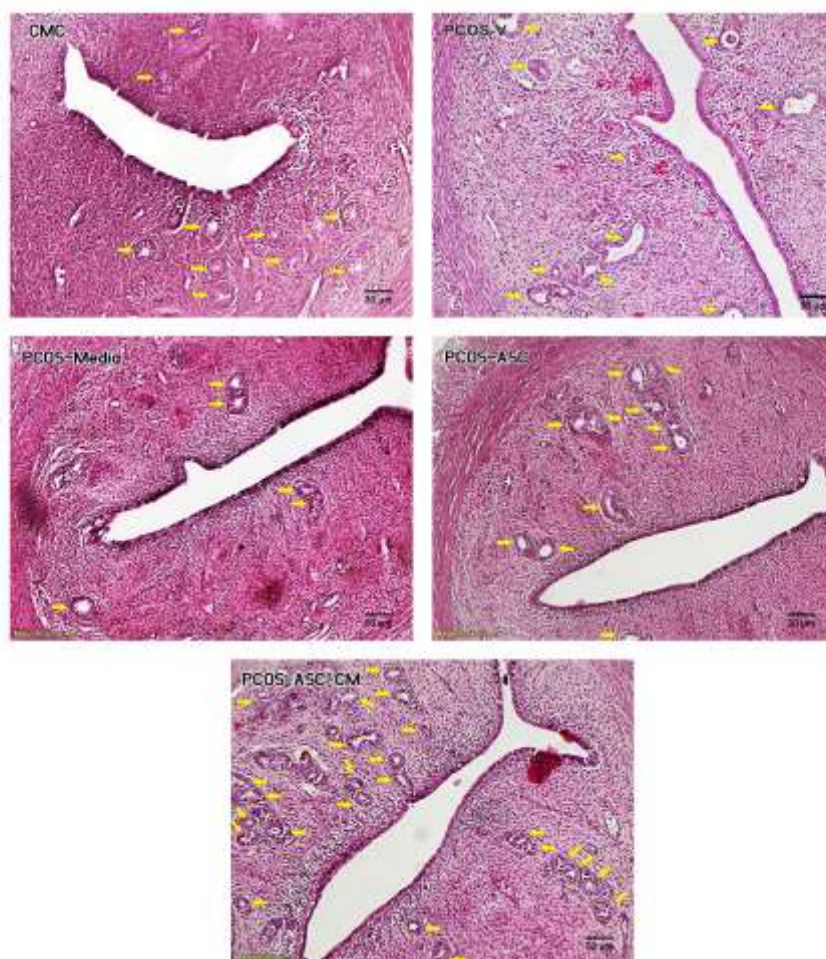
شکل ۴-۴: تصاویر میکروسکوپی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین از سلول‌های اپیتلیالی شاخ رحم موش صحرایی.

مجرای رحم در گروه‌های CMC، PCOS-ASC و PCOS-ASC-CM توسط سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای بلند با هسته‌های کشیده (فلش زرد) و مژک‌های زیادی (فلش قرمز) پوشیده شده است. رحم گروه‌های PCOS-V و PCOS-Media سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای بسیار کوتاه (پیکان زرد) با هسته‌های آپوتوتیک را نشان می‌دهد [مقیاس نوار - ۱۰ میکرومتر، بزرگ‌نمایی ۴۰۰x]. EC; سلول اپیتلیال



شکل ۵-۴: رنگ آمیزی H&E غدد اندومتر موش های صحرایی در گروه های مختلف.

A. غدد اندومتر گروه CMC سلول های اپیتلیال مکعبی ساده (فلش زرد) را نشان می دهند. BI، BII، BIII و BIV. غدد اندومتر حیوانات PCOS-V که با سلول های اپیتلیال سنگفرشی و شکننده (فلش زرد) پوشیده شده است و برخی سلول های التهابی (فلش قرمز) در لومن آنها مشاهده می شود (تصویر با بزرگ نمایی بیش تر). C. گروه PCOS-Media که سلول های اپیتلیال غده سنگفرشی بودند، در حالی که D&E. گروه های PCOS-ASC و PCOS-ASC-CM، سلول های اپیتلیال مکعبی غده ای بافت شناسی طبیعی با سیتوپلاسم کم رنگ و هسته های بزرگ و همچنین مجرای واضح تقریباً مشابه گروه CMC (فلش زرد) را نشان می دهند. [مقیاس بار - ۱۰ میکرومتر، بزرگ نمایی $\times 400$ GL: لومن غده ای].



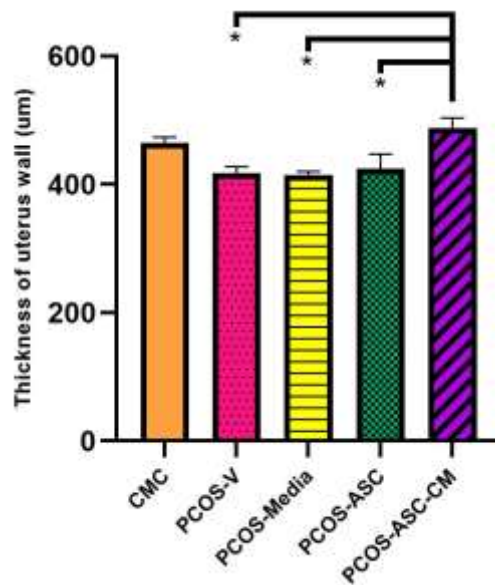
شکل ۶-۴: تراکم غدد در اندومتر گروه های مختلف.

تعداد زیادی غدد (فلش زرد) در سطح مقطع رحم در گروه های CMC و PCOS-ASC-CM دیده شد

در حالی که تعداد کمی از غدد در گروه PCOS-V، PCOS-Media، PCOS-ASC مشاهده شد.

۴-۶- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ضخامت دیواره رحم

همانطور که در شکل ۴-۷ نشان داده شده است، دیوار رحم ضخیم تری در گروه PCOS-ASC-CM در مقایسه با گروه های PCOS-V ($P=0.02$)، PCOS-Media ($P=0.02$) و PCOS-ASC ($P=0.03$) مشاهده شد. با این حال، این پارامتر از نظر آماری تفاوت معنی داری بین گروه های CMC و PCOS-ASC-CM نداشت.



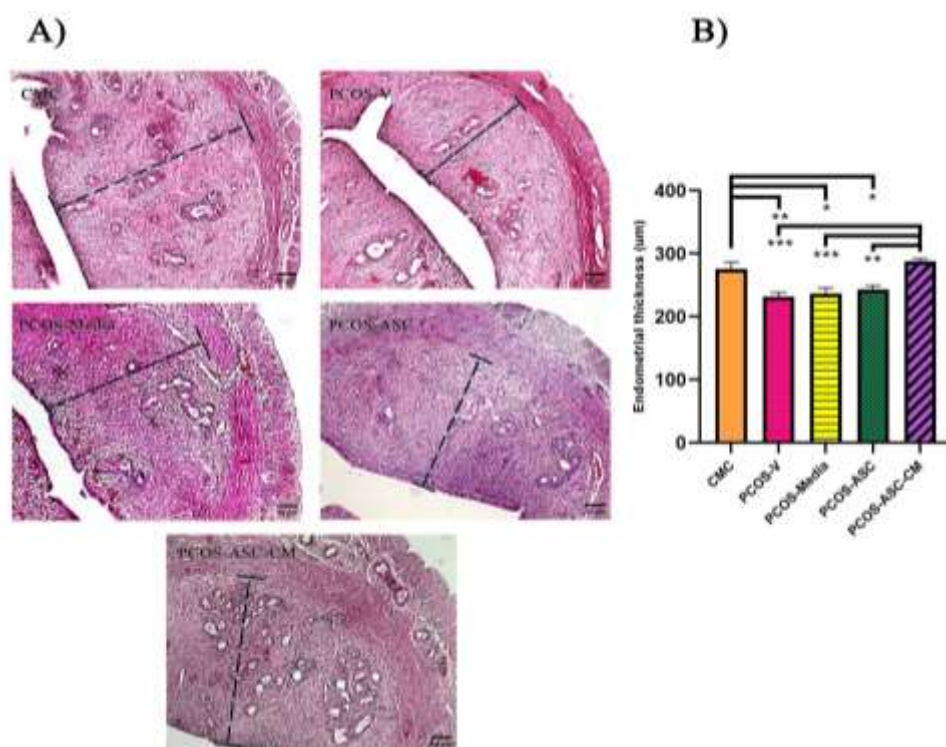
شکل ۴-۷- تاثیر پیوند تخمدانی ASC و ASC-CM بر ضخامت دیواره رحم در مدل موش PCOS.

* $P \leq 0.05$

۴-۷- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ضخامت اندومتر رحم

هنگامی که ضخامت اندومتر بین موش های PCOS درمان نشده و گروه CMC مقایسه شد، کاهش قابل توجهی در این پارامتر در گروه های PCOS-V ($P=0.005$) و PCOS-Media ($P=0.01$) مشاهده شد. با این حال، تجویز ASC و ASC-CM به بافت تخمدان موش های مدل PCOS توانست آن را افزایش دهد، اگرچه این پارامتر در گروه PCOS-ASC-CM در مقایسه با گروه های PCOS-V ($P=0.0004$) و PCOS-Media ($P=0.0009$) به سطح معناداری رسید. همچنین اندومتر در گروه PCOS-ASC در مقایسه با گروه

های PCOS-ASC-CM ($P=0.004$) و CMC ($P=0.04$) به طور معناداری ضخامت کمتری داشت (شکل ۴-۸).



شکل ۴-۸: فتومیکروگرافهای رحم موش صحرایی گروههای مختلف از نظر ضخامت اندومتر (نوارهای نقطه چین)، رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین

(A) [نوار مقیاس - ۳۰ میکرومتر، بزرگنمایی $\times 100$]. B. ضخامت اندومتر در رحم موش‌ها پس از

درمان ۲۴ روزه با ASC و ASC-CM: $P \leq 0.05$ ، $P \leq 0.001$ و $P \leq 0.0001$ ***.

۴-۸- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ارتفاع سلول های اپیتلیالی لومن رحم

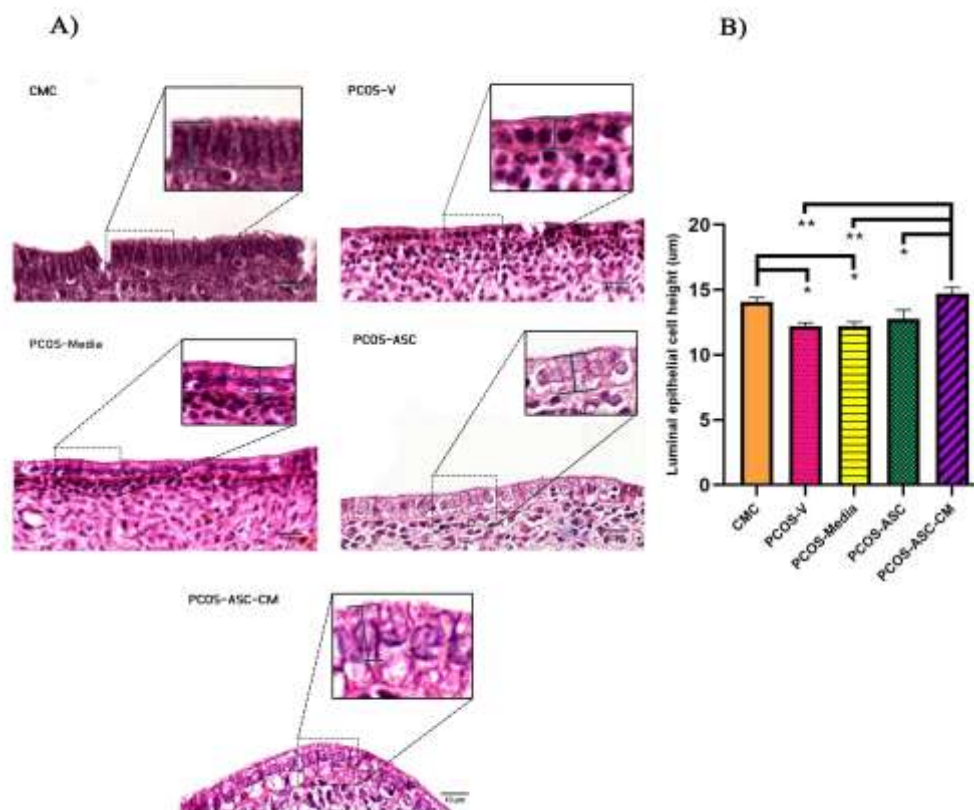
ارزیابی آماری ارتفاع سلول های اپیتلیال لومن رحمی نشان از کاهش قابل توجه این پارامتر در گروه های

PCOS-V ($P=0.05$) و PCOS-Media ($P=0.05$) در مقایسه با گروه CMC داشت. با این حال، تجویز ASC

و محیط بهینه شده آن ها به بافت تخمدان موش های مدل PCOS توانست این تغییر را بهبود بخشد به طوری

که این پارامتر افزایش قابل توجهی را در گروه PCOS-ASC-CM نسبت به گروه های PCOS-V ($P=0.005$)

و PCOS-Media ($P=0.005$) نشان داد. همچنین تفاوت معنی داری بین گروه PCOS-ASC-CM و PCOS-ASC ($P=0.04$) نیز مشاهده شد (شکل ۹-۴).



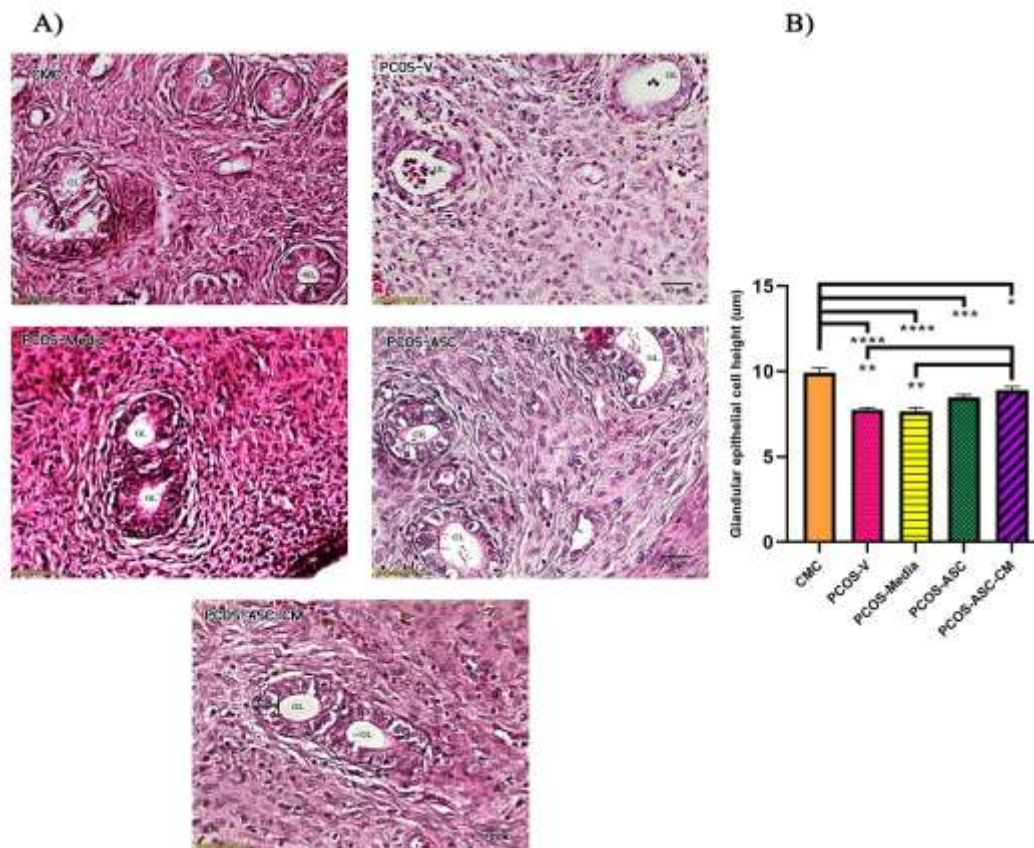
شکل ۹-۴: A. فتومیکروگراف سلول‌های اپیتلیالی مجرای رحم در گروه‌های مختلف

[رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، مقیاس بار- ۱۰ میکرومتر، بزرگنمایی ۴۰۰x]. B. ارتفاع سلول‌های اپیتلیال مجرا در رحم موش پس از ۲۴ روز درمان با ASC و ASC-CM. * و ** به ترتیب $P<0.05$ و $P<0.001$ را نشان می‌دهند.

۹-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر ارتفاع سلول‌های اپیتلیالی غدد رحم

همانطور که در شکل ۱۰-۴ نشان داده شده است، کاهش معنی داری در ارتفاع سلول‌های اپیتلیال غددی در رحم حیوانات گروه‌های PCOS-V ($P=0.0000$) و PCOS-Media ($P=0.0000$) در مقایسه با گروه CMC مشاهده شد. به هر حال پیوند محیط بهینه شده توانست این تغییر را کاهش دهد به طوری که افزایش قابل توجهی در این پارامتر در حیوانات PCOS-ASC-CM در مقایسه با گروه‌های PCOS-V ($P=0.007$) و

PCOS-Media ($P=0.003$) مشاهده شد. با این حال، این مقدار در گروه PCOS-ASC ($P=0.0005$) و PCOS-ASC-CM ($P=0.01$) در مقایسه با گروه CMC هنوز به طور قابل توجهی کمتر بود.



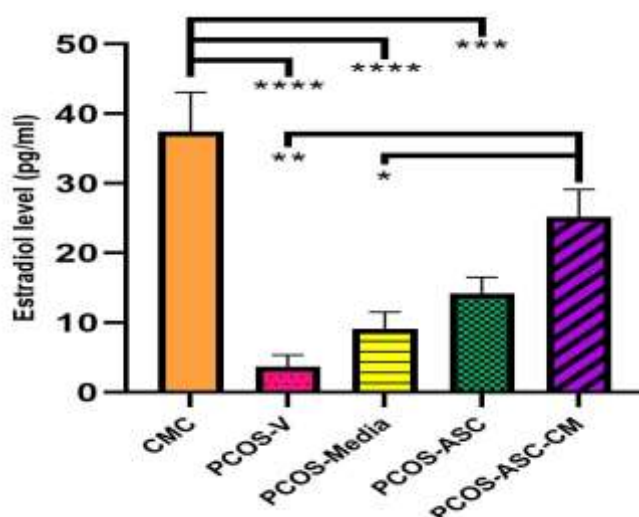
شکل ۱۰-۴: A. فتومیکروگراف غدد رحم در گروه‌های مختلف

[رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین، مقیاس بار- ۱۰ میکرومتر، بزرگنمایی ۴۰۰x]. B. ارتفاع سلول‌های اپیتلیال غده‌ای در رحم موش پس از ۲۴ روز درمان با ASC و ASC-CM. *, **, ***, و **** به ترتیب $P=0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ و $P=0.000$ را نشان می‌دهند. GL; لومن غده‌ای

۱۰-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر سطح هورمون سترادیول

تجزیه و تحلیل آماری سطح هورمون استرادیول نشان داد که این هورمون در گروه‌های PCOS-V ($P=0.0000$) و PCOS-Media ($P=0.0000$) به طور معنی‌داری کمتر از گروه CMC بود. با این حال، سطح آن در گروه‌های PCOS-ASC و همچنین PCOS-ASC-CM افزایش یافت، اگرچه این افزایش در گروه

PCOS-ASC-CM در مقایسه با گروه های PCOS-V ($P=0.002$) و PCOS-Media ($P=0.03$) به سطح معناداری رسید. همچنین بین گروه های PCOS-ASC و CMC تفاوت معناداری مشاهده شد ($P=0.0008$) (شکل ۱۱-۴).

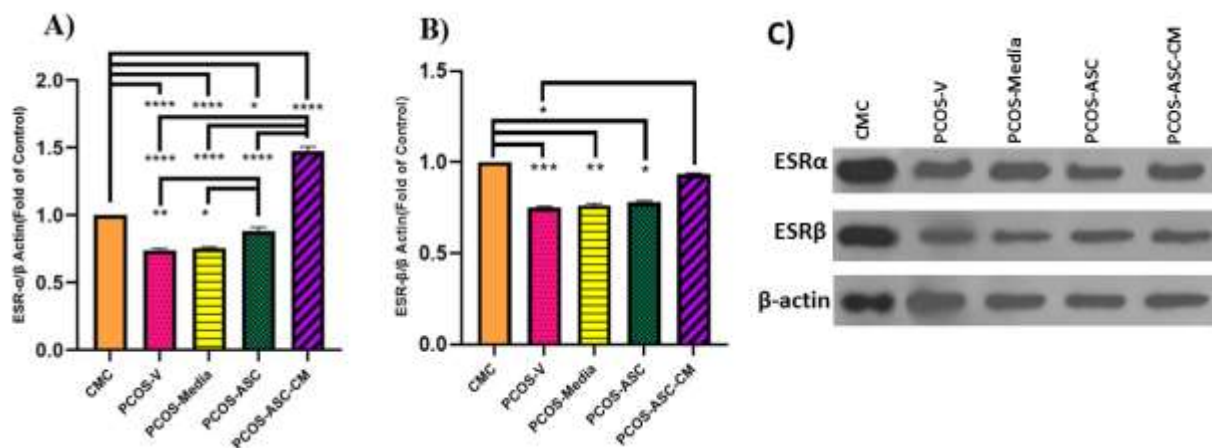


شکل ۱۱-۴: تاثیر پیوند تخمدانی ASC و ASC-CM به مدل موش PCOS بر سطح سرمی استرادیول.

، **، و * به ترتیب نشان دهنده $P \leq 0.05$ ، $P \leq 0.001$ ، $P \leq 0.0001$ و $P=0.0000$ هستند.

۱۱-۴- بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی ASC و ASC-CM بر بیان پروتئین گیرنده های استروژن

همانطور که در شکل ۱۲-۴ نشان داده شده است، هنگام مطالعه بیان پروتئین های $ER\alpha$ و $ER\beta$ مشخص بود که کاهش قابل توجهی در PCOS-V ($P=0.0000$ ، $P=0.003$) و PCOS-Media ($P=0.0000$)، ($P=0.002$) به ترتیب در مقایسه با گروه CMC وجود داشت (شکل ۱۲-۴ A-B). تجویز ASC-CM در گروه PCOS-ASC-CM منجر به افزایش قابل توجه سطح بیان پروتئین $ESR\alpha$ در مقایسه با گروه های PCOS-V ($P=0.0000$)، PCOS-Media ($P=0.0000$)، PCOS-ASC ($P=0.0000$) و حتی CMC ($P=0.0000$) شد. علاوه بر این، گروه PCOS-ASC افزایش قابل توجهی در بیان پروتئین $ESR\alpha$ در مقایسه با گروه PCOS-V ($P=0.005$) و PCOS-Media ($P=0.01$) نشان داد. از نظر بیان پروتئین $ESR\beta$ ، بین گروه PCOS-ASC و CM تفاوت معنی داری وجود داشت ($P=0.03$).



شکل ۱۲-۴: تأثیر تجویز ASC و ASC-CM بر سطح بیان پروتئین

ESRα (A) و ESRβ (B) پس از ۴ هفته درمان در رحم مدل موش PCOS. مقادیر نشان دهنده

میانگین $\pm$ SEM هر گروه است. β -اکتین به عنوان یک کنترل بارگذاری داخلی استفاده شد. *, **, ***، و

**** $P \leq 0.05$ ، ** $P \leq 0.001$ ، *** $P \leq 0.0001$ و $P = 0.0000$ را نشان می دهند.

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۱-۵- بحث

مطالعه ی حاضر نشان داد که محیط بهینه شده حاصل از سلول های بنیادی چربی یا ASC-CM در مقایسه با سلول های بنیادی چربی (ASC) در بهبود پارامترهای مورفومتریک و هیستولوژیک تغییر یافته ی رحمی علاوه بر افزایش سطح سرمی استروژن و بیان گیرنده آن در رحم موش صحرایی مدل PCOS کارآمدتر و موثرتر است.

استروژن یکی از اصلی ترین هورمون های جنسی زنان است که عمدتاً از تخمدان ترشح شده و تغییر غلظت این هورمون در طول فازهای مختلف چرخه قاعدگی (تکثیری، ترشی و قاعدگی) می تواند با کنترل چرخه تکثیر سلولی و آپوپتوز، و حفظ تعادل بین آن ها، عملکرد طبیعی درون رحمی را تضمین کند. با توجه به تاثیرپذیری مستقیم عملکرد اندومتر رحم از وضعیت هورمون های مترشح از تخمدان، هر گونه اختلال در فعالیت نرمال تخمدانی که با تغییر سطوح این هورمون ها همراه باشد، می تواند بر فرآیندهای درون رحم تاثیر منفی بگذارد. یکی از شایع ترین بیماری های تخمدان که با تغییرات سطح سرمی استروژن همراه است سندروم تخمدان پلی کیستیک است. تا کنون مطالعات بسیاری افزایش سطح استروژن را به دلیل تغییر در عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان در زنان مبتلا به این سندروم گزارش داده اند (۱۹)، در حالی که برخی مطالعات، سطح بالای آن را ناشی از کاهش فعالیت آنتاگونیستی پروژسترون بیان کرده اند (۱۲۶). همچنین فعالیت بیش از حد آنزیم آروماتاز که آنزیم کلیدی در سنتز استروژن از تستوسترون می باشد نیز در این افراد می تواند با افزایش طولانی مدت سطح استروژن در دراز مدت منجر به هایپرپلازی و سرطان رحم شود (۱۲۸). به هر حال بر خلاف این مطالعات انسانی، در مطالعه ی حاضر کاهش سطح استروژن در موش های مدل PCOS القا شده با لتروزول مشاهده شد. با توجه به این که لتروزول مهار کننده آنزیم آروماتاز است، بنابراین این کاهش سطح قابل توجیه خواهد بود (۱۲۸). هم سو با مطالعه ی حاضر نیز، مطالعاتی که بر روی موش های مدل PCOS القا شده با لتروزول انجام شده، کاهش سطح این هورمون را در مقایسه با موش های کنترل گزارش داده اند (۸۳، ۱۲۹).

استروژن اثرات بیولوژیکی خود را از طریق گیرنده های استروژنی ($ER\beta$ و $ER\alpha$) در بافت های هدف اعمال می کند. پس از اتصال این هورمون به گیرنده های سیتوپلاسمی خود، تغییرات ساختاری و دایمیریزاسیون در گیرنده ایجاد می شود. سپس کمپلکس هورمون-گیرنده به هسته منتقل شده، به توالی های های پاسخ دهنده به استروژن یا ERE^{47} در کروماتین متصل شده و رونویسی ژن های هدف را با به کارگیری فاکتورهای رونویسی تغییر می دهد. مطالعات نشان داده اند که هر دو ایزوفرم گیرنده های استروئیدی ($ER\alpha$ و $ER\beta$) در رحم وجود دارند اگر چه در چرخه اندومتری ایزوفرم $ER\alpha$ مهم تر از ایزوفرم $ER\beta$ است. به هر حال همراه با تغییر غلظت هورمون استروژن، میزان بیان گیرنده های آن نیز در فازهای مختلف چرخه قاعدگی تغییر می کند. در فاز تکثیری سیکل قاعدگی، هورمون استروژن با اتصال به گیرنده های خود، علاوه بر افزایش تکثیر و فعالیت میتوزی سلول های اندومتر، باعث افزایش بیان گیرنده های آن نیز می شود به طوری که بالاترین سطح گیرنده های آن در اواخر این فاز می باشد؛ همچنین، استروژن در حال افزایش باعث افزایش بیان گیرنده های پروژسترونی اندومتر نیز می شود تا اندومتر بتواند بعد از تخمک گذاری وارد فاز ترشحی شود. در این فاز، پروژسترون مترشحه از جسم زرد، بیان گیرنده های استروژنی و متعاقبا عملکرد استروژن را به خصوص در غدد مهاری کرده، مانع از تکثیر سلولی شده و با برنامه ریزی مجدد اندومتر موجب آغاز تمایز و آماده سازی آن برای پنجره لانه گزینی می شود (۲۱). در غیاب لانه گزینی جنین، کاهش سطح پروژسترون و استروژن موجب خون ریزی و آغاز چرخه قاعدگی می شود (۲۲). نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد که همراه با کاهش سطح استروژن، بیان گیرنده های $ER\alpha$ در بافت رحم موش های مدل PCOS که درمانی نگرفته بودند نیز کاهش یافت. در برخی مطالعات دیگر نیز تغییر بیان گیرنده های استروژنی در بافت تخمدان و رحم گزارش شده است. در مطالعه ی شفیع و همکارانش نشان داده شد که میزان بیان گیرنده های استروژنی در بافت تخمدان موش های مدل PCOS پس از تجویز لتروزول کاهش می یابد (۱۰۲). مطالعه ی دیگری نیز کاهش سطح mRNA ژن $ER\alpha$ و $ER\beta$ را در تخمدان موش های PCOS القا شده با لتروزول گزارش داده است که می تواند بر فولیکولوزن غیرطبیعی بیماران PCOS نقش داشته باشد (۱۳۰، ۱۳۱).

⁴⁷ estrogen response elements

Bacallao و همکارانش افزایش قابل توجهی در بیان پروتئین $ER\alpha$ و $ER\beta$ در رحم زنان مبتلا به PCOS که هایپرپلازی نداشتند مشاهده کردند (۲۳) که این افزایش بیان می تواند تا حدودی با هایپر استروژنیسم متعاقب مواجهه طولانی با استروژن بدون مخالفت پروژسترون، قابل توجیه باشد. به هر حال یکی از پیامدهای سطوح غیر نرمال استروژن بی نظمی سیکل جنسی است به طوری که بی نظمی شایع در چرخه قاعدگی افراد مبتلا به PCOS عمدتاً به تغییرات سطح هورمون استروژن نسبت داده می شود. هم سو با این تغییرات، در مطالعه ی اخیرمان نیز مشاهده کردیم که موش های مدل PCOS القا شده با لتروزول، توقف سیکل استروس در مرحله دی استروس را داشتند (۱۰۲).

از طرفی بر اساس نتایج این مطالعه، پیوند داخل تخمدانی محیط بهینه شده توانست به طور معناداری سطح استروژن و بیان گیرنده های آن را در بافت رحم افزایش دهد. شفيعی و همکارانش نیز چنین افزایشی در سطح هورمون استروژن و تیز بیان گیرنده های تخمدانی آن به دنبال تیمار با CM گزارش دادند که با توجه به تغییرات سطح متیلاسیون تخمدان، به تغییرات اپی ژنتیکی داخل تخمدانی نسبت داده شد. بنابراین ممکن است پیوند داخل تخمدانی محیط بهینه شده با افزایش سطح استروژن، تغییرات اپی ژنتیکی رحمی را القا کرده، مسیر های بیان گیرنده های استروژنی داخل رحم را تغییر داده و موجب تقویت بیان گیرنده استرویدی $ER\alpha$ در رحم شود که نیاز به بررسی های بیش تر مولکولی در سطح استیلاسیون و داستیلاسیون ژنومی دارد. همچنین با توجه به این که آروماتاز می تواند باعث سنتز هورمون استروژن شود و فعالیت این آنزیم در PCOS القا شده با لتروزول مهار شده است، شاید پیوند تخمدانی ASC-CM بتواند موجب از سرگیری فعالیت مهار شده ی آنزیم آروماتاز در تخمدان شده و سطح استروژن را افزایش دهد؛ نظریه ای که تایید آن نیاز به بررسی وضعیت بیان این آنزیم در موش های تیمار شده با ASC-CM دارد. (۱۰۲). به هر حال، به دنبال این تیمار، بهبود سطح استروژن و بیان گیرنده های استروژنی ممکن است محیط استروژنی غیر طبیعی رحم را بهبود بخشیده، پذیرش اندومتری را افزایش داده و موجب کاهش نقایص لانه گزینی و سقط های پس از لانه گزینی گردد که مطالعات بیش تری را برای بررسی میزان لانه گزینی و پیامد بارداری یا pregnancy outcome دارد. همچنین با توجه به اهمیت مسیر سیگنال دهی پروژسترون در عملکرد رحمی و نیز حفظ تناسب بین میزان

سطح استروژن و پروژسترون، بررسی میزان پروژسترون نیز می تواند اطلاعات تکمیلی بیش تری را فراهم نماید. .

از طرفی با توجه به این که یکی از مهم ترین اثرات فیزیولوژیک هورمون های استروژنی، تحریک قوی فعالیت تکثیری است، در نتیجه تغییر سطوح آن می تواند بر مورفولوژی رحم تاثیر گذاشته و تغییرات متنوعی مانند تغییر نوع اپیتلیوم لومینال و غده های اندومتر، شکل غده ها و نسبت غده ها به استروما را سبب شود.

از نظر بافت شناسی رحم از سه لایه اندومتر، میومتر و پریمتر تشکیل شده است که اندومتر آن از اپیتلیوم استوانه ای ساده با غدد اگزوکراین و بافت هم بند خونی تشکیل شده تا بتواند از تکوین جنین حمایت کند (۱۹). فیزیولوژی و ضخامت این لایه و نیز ضخامت دیواره رحم شدیداً به هورمون های استروئیدی (استروژن و پروژسترون) وابسته است به طوری که در طول هر ماه، همراه با تغییرات غلظت این هورمون ها، وضعیت اندومتر از فازهای قاعدگی، تکثیری و ترشحی به صورت چرخه ای تغییر می کند (۲۰). در مطالعاتی گزارش شده که ضخامت رحم (۱۳۲) و همچنین ضخامت اندومتر در افراد مبتلا به PCOS افزایش می یابد (۱۳۳) که در طولانی مدت میتواند منجر به هایپر پلازی رحم و در نهایت سرطان رحم شود اما در مطالعه ای که Sunday Aderemi و همکارانش در سال ۲۰۲۲ انجام دادند نشان دادند که ضخامت اندومتر، ارتفاع اپی تلیال، طول رحم، ضخامت اندومتر و تعداد غدد اندومتر در رحم PCOS که با estradiol valerate القا شده است، کاهش می یابد (۸۳). مطالعه ی دیگری نیز گزارش داد که ضخامت اندومتر در PCOS القا شده با لتروزول، کاهش میابد که هم راستا با نتایج ماست (۲۹). علاوه بر آن، نتایج مطالعه ی حاضر افزایش ضخامت رحم و اندومتر آن را در دو گروه ASC و به خصوص ASC-CM نشان داد، که این افزایش ضخامت می تواند به علت افزایش سطح هورمون استروژن و بیان گیرنده های آن باشد و در کل بهبود وضعیت تغییر یافته ی رحم نسبت به گروه PCOS و نزدیک شدن آن به وضعیت رحم گروه نرمال را نشان دهد. Zhao و همکارانش هم راستا با مطالعه ما نشان دادند که پیوند اگزوزوم سلول های مزانشیمی مشتق چربی به موش هایی که دچار چسبندگی رحم شده بودند، منجر به افزایش ضخامت رحم می شود (۱۰۰) در حالی که مطالعات مخالفی نیز وجود دارند که تاثیری بر ضخامت رحم مشاهده نکردند؛ به عنوان مثال در مطالعه ای که بازوبندی و

همکارانش در سال ۲۰۲۰ اثرات پیوند داخل رحمی محیط بهینه شده ی حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را بر فیبروز رحمی بررسی کردند؛ نشان دادند که پیوند این محیط بر روی ضخامت رحم تاثیری ندارد (۹۹). در مطالعه دیگری نیز نشان دادند که پیوند سلول های بنیادی اثری بر روی ضخامت رحم زنان نابارور ندارد (۱۳۴). به هر حال تمام مطالعاتی که تاکنون انجام شده به پیوند سلول بنیادی و محیط بهینه شده ی حاصل از آن بر بافت رحم پرداخته اند و مطالعه ی حاضر اولین مطالعه ای است که با توجه به وابستگی عملکرد رحم و تخمدان، به بررسی تاثیر پیوند داخل تخمدانی این تیمارها بر وضعیت تغییر یافته ی رحم پرداخته است. بر اساس نتایج این مطالعه، ارتفاع سلول های اپی تلیالی لومن و ارتفاع سلول های اپی تلیالی غدد اندومتر رحمی در دو گروه ASC و به خصوص ASC-CM افزایش می یابد که با افزایش سطح هورمون استروژن در این دو گروه مطابقت داشته و حاکی از بهبود وضعیت رحم در این دو گروه نسبت به گروه PCOS است.

علاوه بر این، وزن رحم و نسبت وزن رحم به وزن بدن در موش های مدل PCOS که تیماری دریافت نکرده بودند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد. کاهش وزن رحم می تواند به دلیل آتروفی ارگان ها و تغییر در ساختار بافت های رحمی به دنبال کاهش سطح استروژن خون باشد (۸۳، ۱۳۵). این نتایج هم راستا با برخی مطالعات است که کاهش وزن رحم را در موش های مدل PCOS القا شده با لتروزول گزارش داده اند (۲۹). همچنین بر اساس نتایج مطالعه ی اخیرمان، با توجه به افزایش وزن بدن موش ها که می تواند ناشی از افزایش چربی شکمی و بهم خوردن سیکل استروس در موش های مدل PCOS القا شده با لتروزول باشد (۲۹)، کاهش نسبت وزن رحم به وزن بدن قابل توجیه است. به هر حال نتایج ما نشان داد که وزن رحم در گروه درمان با محیط بهینه شده نسبت به گروه PCOS افزایش پیدا کرده و به سطح نرمال نزدیک می شود که با توجه به بالا رفتن سطح هورمون استروژن در گروه درمان و به دنبال آن افزایش ضخامت رحم که به دلیل تکثیر لایه اپی تلیال و ساب اپی تلیالی می باشد، قابل توجیه است. بنابراین با کاهش وزن بدن و در عین حال افزایش وزن رحم در گروه PCOS-ASC-CM، نسبت وزن رحم به بدن نیز در این گروه افزایش قابل توجهی را نشان می دهد.

۲-۵- نتیجه گیری

به طور خلاصه، نتایج این مطالعه نشان داد که پیوند محیط بهینه شده حاصل از ASC در مقایسه با سلول های ASC به تخمدان موش های مدل PCOS القا شده با لتروزول، می تواند اثرات مثبت بیش تری را بر شرایط تغییر یافته ی هیستومورفومتریک رحمی، سطح استروژن و نیز بیان رحمی گیرنده ی استروژنی $ER\alpha$ آن موجب شود و یک راهکار در دسترس با مشکلات احتمالی کمتر را در بهبود شرایط رحم فراموش شده در درمان PCOS فراهم می کند.

منابع

1. Ben-Shlomo I, Grinbaum E, Levinger U. Obesity-associated infertility-the earliest known description. *Reproductive biomedicine online*. 2008;17:5-6.
2. Bremer AA. Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2010;8(5):375-94.
3. Trikudanathan S. Polycystic ovarian syndrome. *Medical Clinics*. 2015;99(1):221-35.
4. Islam H, Masud J, Islam YN. An update on Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): diagnosis, risks, etiology, and treatment options revisited: Brac University; 2021.
5. Barthelmess EK, Naz RK. Polycystic ovary syndrome: current status and future perspective. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2014;6:104.
6. Alipour B, Roohelhami E, Rashidkhani B, Shahrkami F, Edalati S. Evaluating indicators of oxidative stress and their relationship with Insulin Resistance in polycystic ovary syndrome. *Prog Nutr*. 2019;21(1-S):178-83.
7. Diamanti-Kandarakis E. PCOS in adolescents. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2010;24(2):173-83.
8. Franks S, Mason H, Polson D, Winston R, Margara R, Reed M. Mechanism and management of ovulatory failure in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 1988;3(4):531-4.
9. Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018;14(5):270-84.

10. Zhang Y, Zhang Y-s, Xue F-x. Characterization of embryonic stem cell model of polycystic ovary syndrome. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2016;52 :507-11.
11. Eyvaznejad E, Nouri M, Ghasemzadeh A, Mehdizadeh A, Shahnazi V, Asghari S, et al. Steroid-depleted polycystic ovarian syndrome serum promotes in vitro oocyte maturation and embryo development. *Gynecological Endocrinology*. 2018;34(8):698-703.
12. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome: Pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies. *Molecular metabolism*. 2020;35:100937.
13. Chen Q, Zheng B, Du S, Lin Y. Explore the potential molecular mechanism of polycystic ovarian syndrome by protein-protein interaction network analysis. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2021;60(5):807-15.
14. Xu X-L, Deng S-L, Lian Z-X, Yu K. Estrogen receptors in polycystic ovary syndrome. *Cells*. 2021;10(2):459.
15. Gustafsson J-Å. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends in pharmacological sciences*. 2003;24(9):479-85.
16. Jensen E, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf W, Jungblut PW, DeSombre E. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1968;59(2):632-8.
17. Artimani T, Saidijam M, Aflatoonian R, Amiri I, Ashrafi M, Shabab N, et al. Estrogen and progesterone receptor subtype expression in granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*. 2015;31(5):379-83.

18. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of cancer*. 2016;7(10):1281.
19. Ferreira SR, Motta AB. Uterine function: from normal to polycystic ovarian syndrome alterations. *Current Medicinal Chemistry*. 2018;25(15):1792-804.
20. Simitsidellis I, Gibson DA, Cousins FL, Esnal-Zufiaurre A, Saunders PT. A role for androgens in epithelial proliferation and formation of glands in the mouse uterus. *Endocrinology*. 2016;157(5):2116-28.
21. Mehasseb MK, Panchal R, Taylor AH, Brown L, Bell SC, Habiba M. Estrogen and progesterone receptor isoform distribution through the menstrual cycle in uteri with and without adenomyosis. *Fertility and sterility*. 2011;95(7):2228-35. e1.
22. Marshall E, Lowrey J, MacPherson S, Maybin JA, Collins F, Critchley HO, et al. In silico analysis identifies a novel role for androgens in the regulation of human endometrial apoptosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(11):E1746-E55.
23. Villavicencio A, Bacallao K, Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecologic oncology*. 2006;103(1):307-14.
24. Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS. *Steroids*. 2013;78(8):782-5.
25. Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson MC, Palomino A, Sir-Petermann T, et al. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2003;80:812-9.

26. Navaratnarajah R, Pillay OC, Hardiman P, editors. Polycystic ovary syndrome and endometrial cancer. *Seminars in reproductive medicine*; 2008 : © Thieme Medical Publishers.
27. Quezada S, Avellaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2006;85(4):1017-26.
28. Hu M, Zhang Y, Feng J, Xu X, Zhang J, Zhao W, et al. Uterine progesterone signaling is a target for metformin therapy in PCOS-like rats. *Journal of Endocrinology*. 2018;237(2):123-37.
29. Haslan MA, Samsulrizal N, Hashim N, Zin NSNM, Shirazi FH, Goh YM. Ficus deltoidea ameliorates biochemical, hormonal, and histomorphometric changes in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21:1-13.
30. Sun G-C, Lovejoy JC, Gillham S, Putiri A, Sasagawa M, Bradley R. Effects of qigong on glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2010;33(1):214-.
31. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, et al. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Medicine and science in sports and exercise*. 2000;32(9; SUPP/1):S498-S504.
32. Nybacka Å, Carlström K, Ståhle A, Nyren S, Hellström PM, Hirschberg AL. Randomized comparison of the influence of dietary management and/or physical exercise on ovarian function and metabolic parameters in overweight women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2011;96(6):1508-13.

33. Nazari T, Zeinal Zadeh M, Esmail Zadeh S. Induction ovulation with use of low dose HMG in patients with Clomiphene Citrate resistant polycystic ovary syndrome (PCOs). *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2003;5(2):19-23.
34. Kelly CJ, Gordon D. The effect of metformin on hirsutism in polycystic ovary syndrome. *European journal of endocrinology*. 2002;147(2):217-21.
35. Choi S-H, Shapiro H, Robinson GE, Irvine J, Neuman J, Rosen B, et al. Psychological side-effects of clomiphene citrate and human menopausal gonadotrophin. *Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology*. 2005;26(2):93-100.
36. Potten CS, Loeffler M. Stem cells : attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110(4):1001-20.
37. Torensma R, Ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clinical Oral Implants Research*. 2003;14(5):569-77.
38. Dennis JE, Carbillet J-P, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):73-82.
39. Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure : possible direct and indirect effects. *Tissue and Cell*. 2016;48(4):370-82.
40. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(6):455-63.

41. Feng P, Li P, Tan J. Human menstrual blood-derived stromal cells promote recovery of premature ovarian insufficiency via regulating the ECM-dependent FAK/AKT signaling. *Stem cell reviews and reports*. 2019;15 :241-55.
42. Su J, Ding L, Cheng J, Yang J, Li Xa, Yan G, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagen scaffolds restores ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction*. 2016;31(5):1075-86.
43. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z, Li H. Current concepts in adult stem cell therapy for stroke. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(29):3565-74.
44. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z, Li H. The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases. *Cell transplantation*. 2007;16(3):273-84.
45. De Becker A, Van Riet I. Homing and migration of mesenchymal stromal cells : how to improve the efficacy of cell therapy? *World journal of stem cells*. 2016;8(3):73.
46. Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem cells and development*. 2011;20(8):1297-308.
47. Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, et al. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem cell research & therapy*. 2013;4:1-9.
48. Rochette L, Mazini L, Malka G, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The crosstalk of adipose-derived stem cells (ADSC), oxidative stress, and inflammation in protective and adaptive responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(23):9262.

49. Xia L, Meng Q, Xi J, Han Q, Cheng J, Shen J, et al. The synergistic effect of electroacupuncture and bone mesenchymal stem cell transplantation on repairing thin endometrial injury in rats. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10:1-14.
50. Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*. 2008;47(5):1634-43.
51. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*. 2010;4(3):214-22.
52. Shojafar E, Mehranjani MS, Shariatzadeh S. Adipose derived mesenchymal stem cells improve the structure and function of autografted mice ovaries through reducing oxidative stress and inflammation: a stereological and biochemical analysis. *Tissue and Cell*. 2019;56:23-30.
53. Kilic S, Yuksel B, Pinarli F, Albayrak A, Boztok B, Delibasi T. Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31:975-82.
54. Shao X, Ai G, Wang L, Qin J, Li Y, Jiang H, et al. Adipose-derived stem cells transplantation improves endometrial injury repair. *Zygote*. 2019;27(6):367-74.
55. Lee SK, Lee SC, Kim S-J. A novel cell-free strategy for promoting mouse liver regeneration: utilization of a conditioned medium from adipose-derived stem cells. *Hepatology International*. 2015;9:310-20.

56. Skalnikova H, Motlik J, Gadher SJ, Kovarova H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. *Proteomics*. 2011;11(4):691-708.
57. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2007;110(10):3499-506.
58. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed research international*. 2014;2014.
59. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6:457-78.
60. Emukah C, Dittmar E, Naqvi R, Martinez J, Corral A, Moreira A, et al. Mesenchymal stromal cell conditioned media for lung disease: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Respiratory research*. 2019;20(1):1-16.
61. Zirakjavanmard M, Atabaki Pashar F. Conditioned medium derived from mesenchymal Stem cells regenerates' defected articular cartilage. *Studies in Medical Sciences*. 2018;29(7):494-501.
62. Abdolmohammadi K, Mahmoudi T, Nojehdehi S, Tayebi L, Hashemi SM, Noorbakhsh F, et al. Effect of hypoxia preconditioned adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2020;10(2):297.
63. De Gregorio C, Contador D, Díaz D, Cárcamo C, Santapau D, Lobos-Gonzalez L, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium ameliorates

polyneuropathy and foot ulceration in diabetic BKS db/db mice. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11:1-21.

64. Nooshabadi VT, Mardpour S, Yousefi-Ahmadipour A, Allahverdi A, Izadpanah M, Daneshimehr F, et al. The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(10):8048-73.

65. Baghaei K, Tokhanbigli S, Asadzadeh H, Nmaki S, Reza Zali M, Hashemi SM. Exosomes as a novel cell-free therapeutic approach in gastrointestinal diseases. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(7):9910-26.

66. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2837.

67. Heidari M, Pouya S, Baghaei K, Aghdaei HA, Namaki S, Zali MR, et al. The immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells-conditioned medium in chronic colitis. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(11):8754-66.

68. Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Shahrokhi S, Hashemi SM, Moradi SLA, Soleimani M. Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets. *International immunopharmacology*. 2014;20(2):316-21.

69. Mancuso P, Raman S, Glynn A, Barry F, Murphy JM. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis : the critical role of the cell secretome. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019;7:9.
70. Emukah C, Dittmar E, Naqvi R, Martinez J, Corral A, Moreira A, et al. Mesenchymal stromal cell conditioned media for lung disease: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Respiratory research*. 2019;20:1-16.
71. Kamal DAM, Ibrahim SF, Ugusman A, Mokhtar MH. Kelulut Honey Regulates Sex Steroid Receptors in a Polycystic Ovary Syndrome Rat Model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(23):14757.
72. Tang Z-R, Zhang R, Lian Z-X, Deng S-L, Yu K. Estrogen-receptor expression and function in female reproductive disease. *Cells*. 2019;8(10):1123.
73. Isobe N, Yoshimura Y. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *Journal of Reproduction and Development*. 2007;53(5):1119-24.
74. Majumder S, Das S, Moulik SR, Mallick B, Pal P, Mukherjee D. G-protein coupled estrogen receptor (GPER) inhibits final oocyte maturation in common carp, *Cyprinus carpio*. *General and comparative endocrinology*. 2015;211:28-38.
75. Zang L, Zhang Q, Zhou Y, Zhao Y, Lu L, Jiang Z, et al. Expression pattern of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in human cumulus granulosa cells (CGCs) of patients with PCOS. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2016;62(3):184-91.

76. Abdul Hamid F, Abu MA, Abdul Karim AK, Ahmad MF, Abd. Aziz NH, Mohd Kamal DA, et al. Sex steroid receptors in polycystic ovary syndrome and endometriosis: insights from laboratory studies to clinical trials. *Biomedicines*. 2022;10(7):1705.
77. Gao X-y, Liu Y, Lv Y, Huang T, Lu G, Liu H-b, et al. Role of androgen receptor for reconsidering the “true” polycystic ovarian morphology in PCOS. *Scientific reports*. 2020;10(1):8993.
78. Paulose T, Hernández-Ochoa I, Basavarajappa MS, Peretz J, Flaws JA. Increased sensitivity of estrogen receptor alpha overexpressing antral follicles to methoxychlor and its metabolites. *Toxicological Sciences*. 2011;120(2):447-59.
79. Fearnley E, Marquart L, Spurdle A, Weinstein P, Webb P. Australian Ovarian Cancer Study Group and Australian National Endometrial Cancer Study Group: Polycystic ovary syndrome increases the risk of endometrial cancer in women aged less than 50 years: An Australian case-control study. *Cancer Causes Control*. 2010;21(12):2303-8.
80. Shafiee MN, Khan G, Ariffin R, Abu J, Chapman C, Deen S, et al. Preventing endometrial cancer risk in polycystic ovarian syndrome (PCOS) women: could metformin help? *Gynecologic Oncology*. 2014;132(1):248-53.
81. Hosseinzadeh P, Barsky M, Gibbons WE, Blesson CS. Polycystic ovary syndrome and the forgotten uterus. *F&S Reviews*. 2021;2(1):11-20.
82. Bracho GS, Altamirano GA, Kass L, Luque EH, Bosquiazazo VL. Hyperandrogenism induces histo-architectural changes in the rat uterus. *Reproductive Sciences*. 2019;26(5):657-68.

83. Adelakun SA, Ukwenya VO, Peter AB, Siyanbade AJ, Akinwumiju CO. Therapeutic effects of aqueous extract of bioactive active component of *Ageratum conyzoides* on the ovarian-uterine and hypophysis-gonadal axis in rat with polycystic ovary syndrome: Histomorphometric evaluation and biochemical assessment. *Metabolism Open*. 2022;15:100201.
84. Wang Z, Wang Y, Yang T, Li J, Yang X. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem cell research & therapy*. 2017;8:1-14.
85. Kilic S, Pinarli F, Ozogul C, Tasdemir N, Naz Sarac G, Delibasi T. Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow-derived mesenchymal stem cells during puberty. *Gynecological Endocrinology*. 2014;30(2):135-40.
86. Kalhori Z, Azadbakht M, Mehranjani MS, Shariatzadeh MA. Improvement of the folliculogenesis by transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells in mice with induced polycystic ovary syndrome. *Cytotherapy*. 2018;20(12):1445-58.
87. Fazeli Z, Abedindo A, Omrani MD, Ghaderian SMH. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: a systematic review. *Stem cell reviews and reports*. 2018;14:1-12.
88. Fu X-f, He Y-l, Xie C-h, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy*. 2008;10(4):353-63.

89. He Y, Chen D, Yang L, Hou Q, Ma H, Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem cell research & therapy*. 2018;9:1-7.
90. Zhang Y, Xia X, Yan J, Yan L, Lu C, Zhu X, et al. Mesenchymal stem cell-derived angiogenin promotes primordial follicle survival and angiogenesis in transplanted human ovarian tissue. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15:1-12.
91. Ding C, Zou Q, Wang F, Wu H, Chen R, Lv J, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function in natural aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Stem cell research & therapy*. 2018;9:1-11.
92. Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Laboratory Investigation*. 2013;93(2):181-93.
93. Ding C, Zou Q, Wang F, Wu H, Wang W, Li H, et al. HGF and BFGF secretion by human adipose-derived stem cells improves ovarian function during natural aging via activation of the SIRT1/FOXO1 signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;45(4):1316-32.
94. Khanmohammadi N, Sameni HR, Mohammadi M, Pakdel A, Mirmohammadkhani M, Parsaie H, et al. Effect of transplantation of bone marrow stromal cell-conditioned medium on ovarian function, morphology and cell death in cyclophosphamide-treated rats. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2018;20(1):10.

95. Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K, et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem cell research & therapy*. 2017;8:1-13.
96. Hong L, Yan L, Xin Z, Hao J, Liu W, Wang S, et al. Protective effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived conditioned medium on ovarian damage. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2020;12(5):372-85.
97. Jafarzadeh H, Nazarian H, Ghaffari Novin M, Shams Mofarahe Z, Eini F, Piryaee A. Improvement of oocyte in vitro maturation from mice with polycystic ovary syndrome by human mesenchymal stromal cell-conditioned media. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(12):10365-75.
98. Lee SH. Human adipose-derived stem cells' paracrine factors in conditioned medium can enhance porcine oocyte maturation and subsequent embryo development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):579.
99. Bazoobandi S, Tanideh N, Rahmanifar F, Zare S, Koohi-Hosseiniabadi O, Razeghian-Jahromi I, et al. Preventive effects of intrauterine injection of bone marrow-derived mesenchymal stromal cell-conditioned media on uterine fibrosis immediately after endometrial curettage in rabbit. *Stem Cells International*. 2020;2020.
100. Zhao S, Qi W, Zheng J, Tian Y, Qi X, Kong D, et al. Exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells restore functional endometrium in a rat model of intrauterine adhesions. *Reproductive Sciences*. 2020;27:1266-75.
101. de Oliveira Tongu EA, Segabinazzi LG, Alvarenga ML, Monteiro A, Papa FO, Alvarenga MA. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm

parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. *Theriogenology*. 2021;169:1-8.

102. Shafiei G, Saheli M, Ganjalikhan-Hakemi S, Haghpanah T, Nematollahi-Mahani SN. Administration of adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium improves ovarian function in polycystic ovary syndrome rats: involvement of epigenetic modifiers system. *Journal of Ovarian Research*. 2023;16(1):238.

103. Xu G, Zhang A, Liu J, Wang X, Feng J, Chen Y. Effects of electroacupuncture on ovarian expression of the androgen receptor and connexin 43 in rats with letrozole-induced polycystic ovaries. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2020;2020:1-13.

104. Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. *BioMed Research International*. 2016;2016.

105. Akbari H, Eftekhar Vaghefi SH, Shahedi A, Habibzadeh V, Mirshekari TR, Ganjizadegan A, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium modulates apoptotic and stress-related gene expression, ameliorates maturation and allows for the development of immature human oocytes after artificial activation. *Genes*. 2017;8(12):371.

106. Geraghty R, Capes-Davis A, Davis J, Downward J, Freshney R, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British journal of cancer*. 2014;111(6):1021-46.

107. Masters JR, Stacey GN. Changing medium and passaging cell lines. *Nature protocols*. 2007;2(9):2276-84.

108. Camacho-Fernández C, Hervás D, Rivas-Sendra A, Marín MP, Seguí-Simarro JM. Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods*. 2018;14:1 – 15.
109. Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A. Cell counting and viability assessment of 2D and 3D cell cultures : expected reliability of the trypan blue assay. *Biological procedures online*. 2017;19:1-12.
110. Li R, Yu G, Azarin SM, Hubel A. Freezing responses in DMSO-based cryopreservation of human iPS cells : aggregates versus single cells. *Tissue Engineering Part C : Methods*. 2018;24(5):289-99.
111. Cottle C, Porter AP, Lipat A, Turner-Lyles C, Nguyen J, Moll G, et al. Impact of cryopreservation and freeze-thawing on therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells and other common cellular therapeutics. *Current stem cell reports*. 2022;8(2):72-92.
112. Zhu SF, Hu HB, Xu HY, Fu XF, Peng DX, Su WY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(9):2108-17.
113. Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*. 2008;47(5):1634-43.
114. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2008;26(8):2173-82.

115. Ra K, Oh HJ, Kim GA, Kang SK, Ra JC, Lee BC. High Frequency of Intravenous Injection of Human Adipose Stem Cell Conditioned Medium Improved Embryo Development of Mice in Advanced Maternal Age through Antioxidant Effects. *Animals*. 2020;10(6):978.
116. Mimouni NEH, Paiva I, Barbotin A-L, Timzoura FE, Plassard D, Le Gras S, et al. Polycystic ovary syndrome is transmitted via a transgenerational epigenetic process. *Cell metabolism*. 2021;33(3):513–30. e8.
117. Pourjafari F, Haghpanah T, Sharififar F, Nematollahi-Mahani SN, Afgar A, Karam GA, et al. Protective effects of hydro-alcoholic extract of *foeniculum vulgare* and *linum usitatissimum* on ovarian follicle reserve in the first-generation mouse pups. *Heliyon*. 2019;5(10).
118. Tilly JL. Ovarian follicle counts-not as simple as 1, 2, 3. *Reproductive biology and endocrinology*. 2003;1:1–4.
119. Mirabolghasemi G, Kamyab Z. Changes of the uterine tissue in rats with polycystic ovary syndrome induced by estradiol valerate. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2017;11(1):47.
120. Sivas MC, Tapisiz OL, Ayik RT, Kahraman D, Altinbas SK, Tekin OM. Effects of melatonin on uterine hypertrophy/hyperplasia: A preliminary experimental rat study. *Heliyon*. 2020;6(10).
121. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 2012;4(9):429.

122. Tie L, Xiao H, Wu D-l, Yang Y, Wang P. A brief guide to good practices in pharmacological experiments: Western blotting. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021;42(7):1015-7.
123. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2010(38):e1918.
124. Al-Tubuly AA. SDS-PAGE and western blotting. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. 2000:391-405.
125. Pan W, Chen W, Jiang X. Microfluidic western blot. *Analytical chemistry*. 2010;82(10):3974-6.
126. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *The Lancet*. 2005;366(9484):491-505.
127. Goncharenko VM, Beniuk VA, Kalenska OV, Demchenko OM, Spivak MY, Bubnov RV. Predictive diagnosis of endometrial hyperplasia and personalized therapeutic strategy in women of fertile age. *EPMA Journal*. 2013;4:1-20.
128. Oner G, Ozcelik B, Ozgun MT, Ozturk F. The effects of metformin and letrozole on endometrium and ovary in a rat model. *Gynecological Endocrinology*. 2011;27(12):1084-6.
129. Ayyadurai T, Thiruppathi SK, Shanmugam A, Diana RKB. Effect of aqueous seed extract of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb., on hormonal assay and lipid profile in induced polycystic ovary syndrome albino female rats. *Int J Bot Stud*. 2021;6(3):139-46.
130. Xu X-L, Huang Z-Y, Yu K, Li J, Fu X-W, Deng S-L. Estrogen biosynthesis and signal transduction in ovarian disease. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:827032.

131. Lee YH, Yang H, Lee SR, Kwon SW, Hong E-J, Lee HW. Welsh onion root (*Allium fistulosum*) restores ovarian functions from letrozole induced-polycystic ovary syndrome. *Nutrients*. 2018;10(10):1430.
132. Shah B, Parnell L, Milla S, Kessler M, David R. Endometrial thickness, uterine, and ovarian ultrasonographic features in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2010;23(3):146-52.
133. Usmani A, Rehman R, Wasim B. Effect of Polycystic Ovaries on the Morphology of Uterus and Ovaries. *Pakistan Journal of Medicine and Dentistry*. 2014;3(02):7.
134. Ma H, Liu M, Li Y, Wang W, Yang K, Lu L, et al. Intrauterine transplantation of autologous menstrual blood stem cells increases endometrial thickness and pregnancy potential in patients with refractory intrauterine adhesion. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2020;46(11):2347-55.
135. Rodriguez Paris V, Edwards MC, Aflatounian A, Bertoldo MJ, Ledger WL, Handelsman DJ, et al. Pathogenesis of reproductive and metabolic PCOS traits in a mouse model. *Journal of the Endocrine Society*. 2021;5(6):bvab060.

Abstract:

Background: Considering the relationship between uterine function and ovarian hormone level and on the other hand, recent reports based on the positive effects of transplantation of condition media derived from adipose stem cells (ASC-CM) on polycystic ovary syndrome (PCOS) phenotypes, this study, for the first time, evaluates the intra-ovarian transplantation effect of ASC-CM in compared to ASC on the altered state of the uterus, estrogen level as well as its receptors expression in PCOS model rat.

Methods: Twenty-five female *Wistar* rats were divided randomly into two groups including the CMC group that received 1% aqueous carboxymethyl cellulose, and the PCOS group that received 1 mg/kg letrozole. After confirmation of the PCO induction, the PCOS animals were allocated into four subgroups: 1-PCOS-ASC (given 2×10^6 ASC), 2- PCOS-ASC-CM (given condition media-derived from ASC), 3- PCOS-Media (given culture medium), and 4- PCOS-V (given normal saline). Twenty-four days after administration, the animals were weighed and then sacrificed. The uterus tissues were removed and weighed. Uterine histomorphometrical, and also immunoblotting assessments of estrogen receptors (ER α and ER β) were done. Also, the sera were obtained for evaluation of estrogen hormone level.

Results: Uterine histopathological conditions such as altered lining epithelial cells of the lumen, and glands as well as significant reductions of the heights of the luminal and glandular epithelial cells were observed in the non-treated PCOS animals (PCOS-V and PCOS-Media) when compared to those of the CMC group. Moreover, their estrogen level and both ER α and ER β expression levels were also decreased. However, the administration of ASC-CM compared to

the ASCs led to more amelioration effects in these altered parameters which were confirmed with histological, biochemical, and molecular examinations.

Conclusion: Transplantation of ASC-CM compared to ASC could induce more estrogenic histological changes in the PCOS uterine status alterations, which suggests a useful strategy for improvement of forgotten uterine status in PCOS phenotypes.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, Adipose stem cell, condition media, Uterus, estrogen hormone, Estrogen receptors



**KERMAN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES**

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree MSc Anatomical Sciences

Title

**Administration Effect of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell and its
Conditioned Media on Uterine Morphometric and Histologic Parameters and Also
the Level of Estrogen Hormone and the Expression of its Receptors in a Rat Model
of Polycystic Ovary Syndrome**

By

Reihane Nghibzade Tahami Zarandi

Supervisor

Dr. Tahereh Haghpanah

Advisors

Dr. Seyed Nouredin Nematollahi/Mahani, Dr. Someyeh Solhjoo

Thesis No:

Date (**July 2024**)

