

## A Comparison of Two Mouse Endometriosis Models using Endometrial Tissue Fragments and Endometrial Isolated Cells

Rana Sadafi<sup>1</sup>, Mina Jafarabadi<sup>2\*</sup>, Mojdeh Salehnia<sup>3\*\*</sup>, Nasim Ghorbanmehr<sup>4</sup>

- 1- M.Sc., Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Reproductive Health Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 3- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 6561114477, Reproductive Health Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
Email: minajaf@yahoo.com

\*\*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: salehnm@modares.ac.ir

Received: 21/Jun/2014, Accepted: 27/Sep/2014

### Abstract

**Objective:** Endometriosis is a common disease in which the endometrial stroma and glands grow abnormally outside the uterine cavity. The establishment of animal models can be effective for determining the etiology of endometriosis. In this study we compare two endometriosis models using endometrial fragments and isolated cultured endometrial cells.

**Methods:** We obtained endometrial tissues that were in the proliferative or secretory phases from women who underwent hysteroscopies for benign reasons at Imam Khomeini Hospital (Tehran). Following confirmation of the tissue's normality, we cut the tissues into 2 mm cube pieces. The remainder of endometrial tissues were used for isolation and cultured to the fourth passage. In the first model of endometriosis, the endometrial tissue fragments and in the second model,  $2 \times 10^6$  isolated endometrial cells were subcutaneously transplanted into gamma irradiated mice. The mice were kept under controlled, sterile conditions for 20 days. The mice sera were collected before and after transplantation for assessment of  $17\beta$  estradiol. The ectopic tissues in both models were assessed for morphological staining using hematoxylin and eosin, as well as periodic acid Schiff (PAS) for gland secretion. The gland sections per  $\text{mm}^2$  were analyzed.

**Results:** At 20 days after tissue transplantation, we observed endometrial-like glands in the subcutaneous tissue of both endometriosis models. The number of gland sections was  $57.55 \pm 17.18/\text{mm}^2$  for the first model and  $271.57 \pm 77.98/\text{mm}^2$  for the second model. This result was significantly higher in the second model when compared to the first model. Gland secretion was positive for PAS. The level of  $17\beta$  estradiol was higher in both models compared to the control group. This level was significantly higher in the second model compared to the first ( $P \leq 0.05$ ).

**Conclusion:** The endometriosis model that used cultured endometrial cells showed more efficiency in morphology, gland formation and level of  $17\beta$  estradiol.

**Keywords:** Endometriosis, Endometrial Cells, Endometrial Fragments, Estrogen

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 17 (2014-2015), No. 4, Pages: 41-51

## مقایسه دو مدل اندومتريوز در موش با استفاده از قطعات بافت و سلول‌های جدا شده آندومتر انسان

رعنا صدفی<sup>۱</sup>، مینا جعفر آبادی<sup>۲\*</sup>، مژده صالح نیا<sup>۳\*</sup>، نسیم قربانمهر<sup>۴</sup>

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

۲- استادیار، مرکز تحقیقات باروری بیمارستان امام خمینی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۶۵۶۱۱۴۴۷۷، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات باروری بیمارستان امام خمینی  
Email: minajaf@yahoo.com

\*\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح  
Email: salehnm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۷/۰۵

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۳۱

### چکیده

**هدف:** اندومتريوز بیماری شایعی است که طی آن غدد و استرومای آندومتر در بیرون از حفره رحمی به صورت نا به جا رشد می‌کند. ایجاد مدل‌های حیوانی برای ارزیابی این بیماری کمک کننده خواهد بود. بنابراین در این مطالعه سعی شد دو مدل حیوانی اندومتريوز با استفاده از قطعات بافت و سلول‌های جدا شده آندومتر انسان ایجاد شود و با هم مقایسه شود.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا بافت آندومتر انسان در فاز تکثیری یا ترشحی از زنان بستری در بیمارستان امام خمینی تهران که تحت هیستروسکوپی به علل خوش خیم قرار گرفته بودند تهیه شد و پس از تأیید سالم بودن بافت، قسمتی از بافت آندومتر انسان به تکه‌هایی به ابعاد ۲ میلی‌متر مکعب بریده شد و بقیه بافت برای جداسازی سلول‌ها و کشت تا چهار مرحله استفاده شد. در مدل اول تکه‌های آندومتر به ابعاد ۲ میلی‌متر مکعب و در مدل دوم  $2 \times 10^6$  سلول آندومتر حاصل از پاساژ چهارم به صورت زیر جلدی به موش‌های تحت تیمار با اشعه گاما منتقل شد و به مدت ۲۰ روز موش‌ها در شرایط کنترل شده و استریل نگهداری شدند. خون‌گیری از موش‌ها قبل و پس از پیوند برای تعیین سطح استروژن انجام گرفت و بافت اکتوپیک ایجاد شده در هر دو مدل جمع‌آوری شدند و برای ارزیابی ریخت‌شناسی با به‌کارگیری رنگ همتوکسیلین و اتوزین و بررسی ترشحات غدد از واکنش اسید پریودیک شیف استفاده شد همچنین تعداد مقاطع غدد در واحد سطح محاسبه و شمارش شد.

**نتایج:** ۲۰ روز پس از پیوند بافت غددی شبیه بافت آندومتر در زیر جلد موش در هر دو مدل دیده شد و تعداد مقاطع غدد در واحد سطح میلی‌متر مربع در مدل اول  $17/18 \pm 57/55$  و در مدل دوم  $271/57 \pm 77/98$  بود. وسعت غدد ایجاد شده در مدل دوم بیشتر از مدل اول بود ( $P \leq 0/05$ ) و ترشحات غدد با رنگ‌آمیزی اسید پریودیک شیف واکنش مثبت داشت. همچنین میزان استروژن تولید شده در هر دو مدل نسبت به گروه کنترل سالم بیشتر و در مدل دوم نیز بیشتر از مدل اول بود ( $P \leq 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** در مجموع مدل اندومتريوز با به‌کارگیری سلول‌های آندومتر کشت شده، کارایی بیشتری را از نظر ریخت‌شناسی، سطح غدد شکل گرفته و فعالیت استروژنی بالا نشان داد و می‌تواند در مطالعات اندومتريوزی از این مدل استفاده شود.

**کلیدواژگان:** اندومتريوز، سلول‌های آندومتر، قطعات بافت آندومتر، استروژن

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۴۱-۵۱

رشد غدد و استرومای آندومتر در خارج از رحم اندومتریوز (Endometriosis) نامیده می‌شود و یکی از شایع‌ترین دلایل ناباروری است که تقریباً ۱۰ درصد از زنان را در سنین باروری مبتلا می‌کند [۱]. اندومتریوز با طیفی از علائم همراه است که شایع‌ترین آن‌ها درد مزمن لگنی و ناباروری است [۲]. نمای ظاهری اندومتریوز متفاوت است و به شکل کیست‌های ریز اندومتریوزی روی اعضای لگن تا کیست‌های بزرگ آندومتریومایی تخمدان که آناتومی لوله‌های رحمی و تخمدان را بر هم می‌زند قابل مشاهده است [۳].

این بیماری به‌طور شایع در لگن در محل‌هایی مثل تخمدان، بن‌بست رحمی مثانه خلفی، لیگامان رحمی، پریتون (Peritoneum) لگنی و دیواره بین رکتوم و واژن (Rectovaginal Septum) مشاهده شده است [۴-۶]. اندومتریوز خارج لگنی هنگامی تعریف می‌شود که ضایعات آندومتریوتیک جای دیگری در بدن مثل سرویکس (Cervix)، روده، سیستم ادراری، جدار شکم، قفسه سینه، ریه و سیستم اعصاب مرکزی یافت شود [۷].

اندومتریوز به‌ندرت ممکن است جلد یا زیر جلد را درگیر کند. شایع‌ترین محل بروز اندومتریوز جلدی، جدار شکم است و معمولاً به شکل ثانویه و به دنبال اقدامات جراحی انجام شده روی جدار شکم و لگن، در محل اسکار (Scar) جراحی رخ می‌دهد، اما می‌تواند به شکل نادر به‌صورت خود به خودی، بدون عمل جراحی قبلی ظاهر شود. این موارد بیشتر روی اسکار فیزیولوژیک در محل ناف ظاهر می‌شود [۸، ۹].

باوجود شناخت این بیماری از حدود صد سال پیش، هنوز علت اصلی اندومتریوز ناشناخته است هر چند که تئوری‌های زیادی برای علت این بیماری مطرح شده است [۱۰-۱۲]. طبق تئوری سامپسون (Sampson) در سال ۱۹۲۷، خون قاعدگی از طریق لوله‌های رحم، به داخل لگن پس زده و سلول‌های زنده آندومتر در حفره پریتون و روی تخمدان‌ها کاشته شده و رشد می‌کنند [۱۳]. اندومتریوز جلدی با کاشت ایاتروژنیک

## سلول‌های جدا شده آندومتر و مدل اندومتریوز

(Iatrogenic) آندومتر در دیواره شکم ایجاد می‌شود و این تئوری یک توجیه احتمالی برای اندومتریوز در محل‌های اپیزیوتومی (Episiotomy)، سزارین و سایر اسکارهای جراحی است و در این روش انتشار سلول‌های آندومتر از طریق عروق خونی و لنفی انجام می‌شود [۱۴]. استروژن هورمون ایجاد کننده صفات زنانه است که ارتباط مستقیمی با بروز اندومتریوز دارد و حتی علائم این بیماری در افرادی که سطوح بالاتری از استروژن دارند شدیدتر است [۱۵، ۱۶]. بافت آندومتر اکویپیک (Ectopic Endometrium) مقدار غیرطبیعی از آنزیم آروماتاز (Aromatase) را دارد و این آنزیم مسئول تبدیل آندرواستندیون (Androstenedione) و استرون و تستوسترون به ۱۷ بتا استرادیول است [۱۷، ۱۸].

برای فهم بهتر بیماری اندومتریوز، مطالعات متعددی در سراسر جهان روی این بیماری انجام شده ولی از آنجایی که مطالعه روی جنبه‌های مختلف این بیماری در انسان از نظر اخلاقی مقبول نیست، بنابراین انجام مطالعات تجربی روی حیوانات آزمایشگاهی کمک کننده است. رشد نا به‌جای بافت آندومتر در محل‌های مختلف یافته جدیدی نیست [۱۹]. محمدرزاده و همکارانش تکه‌های بافت آندومتر انسان را به نقاط مختلف بدن رت پیوند زده و بیان کردند که ناحیه زیر جلد شایع‌ترین محل رشد بافت آندومتر است [۲۰]. در سال ۲۰۰۱، گرومر (Grümmer) مشاهده کرد که قطعات بافت آندومتر انسان که به نقاط مختلف بدن موش پیوند زده می‌شود قدرت رشد دارد [۲۱]. مطالعه لیو (Liu) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان داد که میزان فلورسانس در سلول‌های آندومتر تزریق شده بیشتر از تکه‌های آندومتر است و سلول‌های آندومتر توانایی بیشتری را در ایجاد بافت آندومتر در ناحیه زیر جلد دارند [۲۲]. در سال ۲۰۱۱، کرولو (Cervelló) و همکارانش مشاهده کردند که سلول‌های اپیتلیال و استرومایی آندومتر انسان که به ناحیه زیر کپسول کلیه تزریق شده بودند، قدرت تشکیل بافت آندومتر را داشتند [۲۳].

در مطالعات انجام شده در مدل‌های موشی اغلب از قطعات

بافتی آندومتر استفاده شده است و تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از سلول‌های جدا شده و کشت شده آندومتر وجود ندارد و این تحقیق برای اولین بار در این زمینه صورت می‌گیرد تا توانایی سلول‌های آندومتر جدا شده و کشت شده به منظور ایجاد مدل آندومتریوز ارزیابی شود. بیش جدید در علل ایجاد آندومتریوز با استفاده از مدل‌های موشی به عنوان یک مدل آندومتریوز به دست خواهد آمد و بنابراین مدل‌های حیوانی به ایجاد ابزارهای تشخیصی غیرتهاجمی جدید و پیشرفت روش‌های درمانی برای درمان بهتر آندومتریوز کمک خواهد کرد.

هدف از این مطالعه ایجاد آندومتریوز با روش کاشت قطعات آندومتر در مقایسه با تزریق سلول‌های آندومتر کشت شده در ناحیه زیر جلد موش‌های تحت تیمار با اشعه گاما است. مقایسه این دو مدل آندومتریوز هم از نظر بافت اکتوپیک شکل گرفته و هم از نظر سطح ۱۷ بتا استرادیول تولید شده صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری و کشت بافت آندومتر انسان

جمع‌آوری بافت آندومتر از زنان بستری در بیمارستان امام خمینی تهران که تحت هیستروسکوپی (Hysteroscopy) به دلایل خوش‌خیم قرار گرفته بودند (تعداد ۵ بیمار) با کسب رضایت‌نامه از آن‌ها انجام شد. بیماران در محدوده سنی ۲۰-۴۴ ساله بوده و ۳ ماه قبل از جراحی هورمونی دریافت نکرده بودند و چرخه قاعدگی منظمی داشتند. بافت آندومتر در فاز تکثیری یا ترشچی از بیماران جمع‌آوری شد. پس از دریافت، قسمتی از بافت آندومتر برای ارزیابی میکروسکوپی و آسیب‌شناسی تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (Hematoxylin and Eosin; H&E) قرار گرفت.

نمونه‌ها پس از بررسی بافتی از نظر سالم بودن و تأیید توسط آسیب‌شناس برای مطالعات بعدی استفاده شد. بقیه بافت

در محیط DMEM/F-12 (Dulbecco Modified Eagle Medium /Hans F-12) که حاوی سرم آلبومین انسانی (Fetal Bovine Serum: FBS) ۱۰ درصد بود در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حداکثر تا ۲ ساعت نگهداری شد. سپس قسمتی از بافت آندومتر ۳ بار با بافر فسفات سالیین (Phosphate Buffered Saline: PBS) شسته شد و تحت شرایط استریل به تکه‌هایی به ابعاد ۲ میلی‌متر مکعب بریده شد و بقیه بافت آندومتر در معرض آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۳ (۳۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و (۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر Deoxyribonuclease type I; DNAase) و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> درصد به مدت دو ساعت قرار گرفت و پس از آن از فیلترهایی به ابعاد ۱۵۰ و ۱۰۰ و ۴۰ میکرومتر عبور داده شد و سلول‌های جداسازی شده در بخش زیرین فیلتر به منظور کشت در نظر گرفته شدند. سپس سلول‌ها در ظرف‌های کشت ۳ سانتی ریخته شد و محیط سلول‌ها یک روز در میان تعویض می‌شد تا این که سلول‌ها تقریباً به شکل یک دست تمام کف ظرف کشت را پر کردند. سپس با به‌کارگیری تریپسین (Trypsin) از آن‌ها کشت مجدد تهیه شد [۲۲، ۲۴]. سلول‌ها پس از ۴ پاساژ به تعداد  $2 \times 10^6$  سلول در هر بار برای پیوند استفاده شدند. ابتدا سلول‌ها با بافر فسفات سالیین شسته شدند تا محیط کشت حذف شود و سپس برای پیوند استفاده شدند.

### آماده‌سازی موش‌های اشعه دیده

طبق موافقت کمیته اخلاق دانشکده موش‌های سوری ماده از نژاد NMRI (National Medical Research Institute) و با سن بین ۸-۱۰ هفته تهیه و در بخش رادیوتراپی بیمارستان شهدا تحت تابش اشعه گاما با دوز ۷/۵ گری به مدت ۷ دقیقه قرار گرفتند و بدین وسیله سیستم دفاعی موش‌ها تضعیف شد. غذا، آب، قفس و پوشال مورد استفاده اتوکلاو شده و به آب حیوانات، آنتی‌بیوتیک اضافه شد و تا انتهای مطالعه تحت

## سلول‌های جدا شده اندومتر و مدل اندومتريوز

هر دو گروه (در هر گروه حداقل ۵ راس موش) همراه با پوست برداشته شد و در محلول ۱۰ درصد فرمالین برای مطالعه ریخت‌شناسی با رنگ‌آمیزی H&E و واکنش اسید پریودییک شیف (Periodic acid-Schiff: PAS) به مدت ۴۸-۷۲ ساعت تثبیت شد.

## رنگ‌آمیزی ریخت‌شناسی و واکنش PAS

پس از ثبوت بافت‌ها (تعداد ۵ نمونه) و پاساژ آن‌ها و قالب‌گیری در پارافین، برش‌های سریال بافتی با ضخامت ۵ میکرون از بافت تهیه شد و سپس به تعداد ۲۰-۳۰ برش از مناطق مختلف بافت جمع‌آوری و با رنگ‌آمیزی H&E و تعدادی (حداقل ۵ برش) با رنگ‌آمیزی PAS رنگ‌آمیزی شد. برای رنگ‌آمیزی H&E ابتدا برش‌ها پس از پارافین‌زدایی و آب‌رساندن در محلول هماتوکسیلین و سپس در محلول ائوزین قرار داده شد، سپس برش‌ها بعد از آب‌گیری با الکل و شفاف‌سازی با زیلل و با چسب انتلان چسبانده شد. برای رنگ‌آمیزی PAS نیز بعد از آب‌رساندن برش‌های بافتی در محلول آبی اسید پریودییک ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه اکسیده شد و بعد از شستشو در معرف شیف به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین، برش‌ها با الکل آب‌گیری و با زیلل شفاف‌سازی و با چسب انتلان چسبانده شد، سپس در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شد.

## تعیین تعداد مقاطع غدد در واحد سطح

برای تعیین تعداد مقاطع غدد در واحد سطح از هر مدل سه نمونه و جمعاً شش نمونه و ۱۵ میدان دید در هر یک از دو مدل بررسی شد، پس از تهیه تصاویر با بزرگنمایی ثابت از حداقل پنج میدان دید از هر نمونه (قسمت‌های مختلف بافت اکتوپیک ایجاد شده) در دو مدل، با به‌کارگیری نرم‌افزار Image J، ابتدا سطح مقاطع تصاویر بر حسب میلی‌متر مربع محاسبه و سپس تعداد مقاطع غدد در واحد سطح میلی‌متر مربع تعیین شد.

شرایط استریل نگهداری شدند.

## پیوند سلول‌های جدا شده و قطعات اندومتر به موش

قبل از پیوند برای تعیین مراحل مختلف دوره موش، اسمیر واژن از موش‌ها تهیه شد و موش‌ها در مرحله پرواستروس (Proestrus) آماده مطالعه شدند (تعداد ۱۰ سر موش). موش‌های گیرنده به کمک تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ۱۰ درصد کتامین (Ketamine) و ۲۰ درصد زایلزین (Xylazine) بیهوش شدند (تعداد ۵ راس موش در هر گروه). در هر موش از گروه اول ۴ تکه اندومتر به ابعاد ۲ میلی‌متر مکعب به صورت زیر جلدی به موش پیوند و محل پیوند با نخ بخیه بسته شد. در هر موش از گروه دوم  $2 \times 10^6$  سلول اندومتر انسانی همراه با ۲۰۰ میکرولیتر PBS به وسیله سرنگ انسولین از راه زیر جلدی به ناحیه زیرپوستی موش‌های تحت تیمار با اشعه گاما تزریق شد. سپس موش‌ها به مدت ۲۰ روز در شرایط کنترل شده نگهداری شدند.

## خونگیری از موش‌ها

پس از پایان دوره آزمایش موش‌های دو مدل اندومتريوز و نیز گروه کنترل (موش‌های بدون پیوند در مرحله پرواستروس) توسط اتر بیهوش شدند و خون‌گیری از قلب در هر دو گروه مورد مطالعه انجام گرفت ( $n=6$ ). نمونه‌های خونی با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و سرم آن‌ها جدا و در دمای ۲۰- تا زمان سنجش میزان هورمون نگهداری شدند. سپس با استفاده از کیت و با به‌کارگیری دستگاه گاماکانتر (Gamma Counter) میزان هورمون ۱۷ بتا استرادیول نمونه‌های خونی اندازه‌گیری شد.

## نمونه‌برداری از بافت اکتوپیک

بعد از ۲۰ روز، موش‌ها به وسیله جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و بافت اکتوپیک ایجاد شده در زیر جلد در

## تجزیه و تحلیل آماری

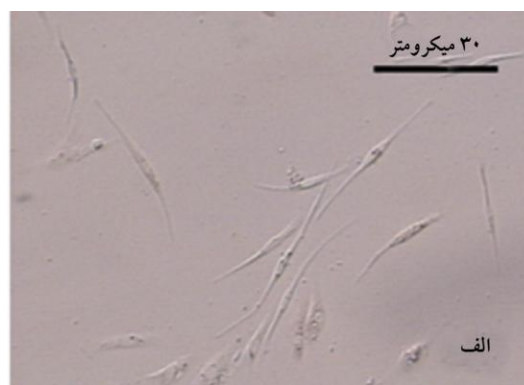
بعد از جمع‌آوری اطلاعات، تجزیه و تحلیل با روش‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) و توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) انجام شد.

## نتایج

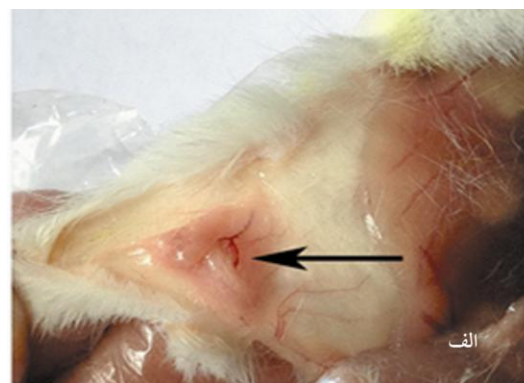
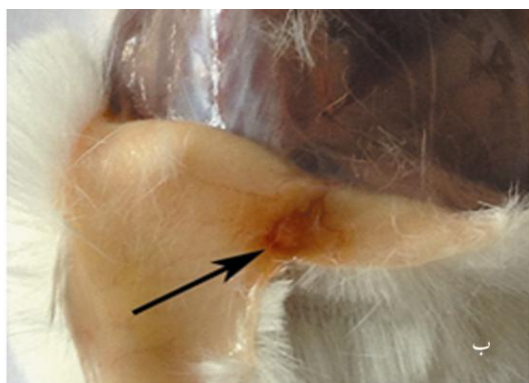
### ویژگی سلول‌های کشت شده

سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه به کف فلاسک

چسبیدند. با گذشت ۷۲ ساعت، این سلول‌ها دوکی شکل شده و از نظر ریخت‌شناسی شبیه به سلول‌های فیروبلاست شدند. سلول‌ها با سرعت تقسیم شدند و دو روز پس از اولین پاساژ سلولی به تراکم سلولی مناسب رسیدند و از نظر ریخت‌شناسی پس از ۴ پاساژ، ظاهری نسبتاً یک‌دست و یکنواخت به دست آورده و برای پیوند استفاده شدند. تصاویر سلول‌های کشت شده پس از ۲۴ ساعت و پایان پاساژ ۴ در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱ فاز کنتراست سلول‌های آندومتر انسان ۲۴ ساعت پس از کشت (الف) و پس از پاساژ چهارم (ب)



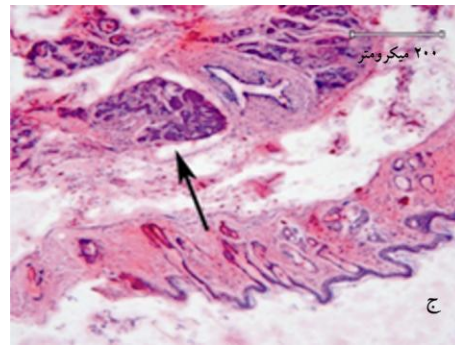
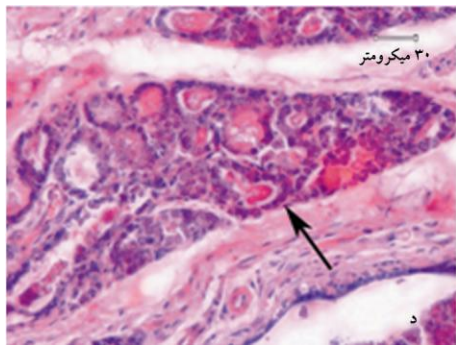
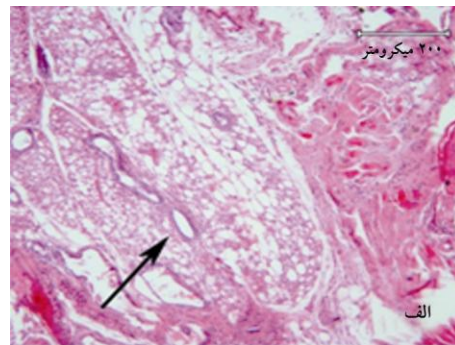
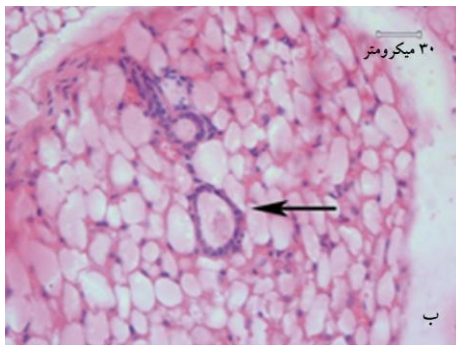
شکل ۲ تصویر بافت اکتوپیک ایجاد شده زیر جلدی در مدل اول (الف) و دوم اندومتریوز (ب): بافت نمای کیستیک و پرخون دارد و فلش سیاه رنگ محل بافت اکتوپیک را نشان می‌دهد.

### سلول‌های جدا شده آندومتر و مدل آندومتریوز

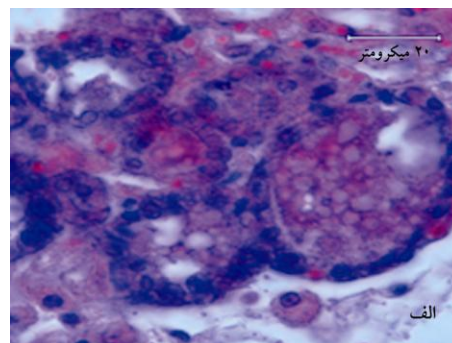
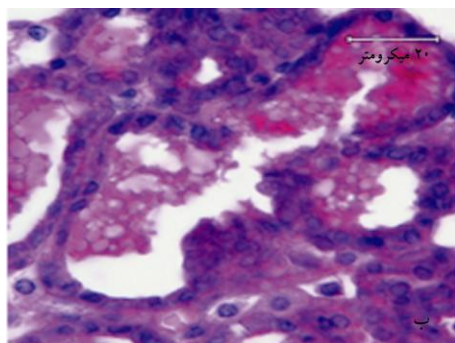
نظر ریخت‌شناسی طبیعی بودند و علایمی از تخریب سلولی و مرگ سلولی در آن‌ها دیده نشد. در مدل دوم نیز ۲۰ روز پس از تزریق سلول‌ها، بافت اکتوپیک و رگ‌های خونی در محل مشهود بود (شکل ۳ ج و د). غدد به وسیله سلول‌های اپیتلیال مکعبی و سنگ‌فرشی پوشیده شده بود. سلول‌های استرومایی نیز در بخش‌هایی از بافت قابل مشاهده بودند. در مقایسه با بافت اکتوپیک حاصل از پیوند قطعات آندومتر، غدد به تعداد بیشتر و ترشحات فراوان‌تر مشهود بود. ترشحات غدد PAS مثبت بود و واکنش شدیدی را نشان داد (شکل ۴).

### ریخت‌شناسی بافت اکتوپیک در دو مدل آندومتریوز

در شکل ۲ نمایی از بافت اکتوپیک در دو مدل آندومتریوز که نشان دهنده شکل‌گیری بافت غددی بود پس از ۲۰ روز دیده می‌شود. بافت نمای کیستیک و پرخون داشت. در برش‌های بافتی و رنگ‌آمیزی شده با H&E در مدل اول (شکل ۳ الف و ب) از لحاظ ریخت‌شناسی غدد اپیتلیوم مکعبی داشته و دارای قطر و ابعاد مختلفی بودند و در بین بافت چربی زیر پوست قرار گرفته و دهانه آن‌ها وسیع بود. در برخی نقاط استروما در اطراف غدد مشاهده شد. همچنین عروق خونی نیز در زمینه استروما مشهود بود. سلول‌ها از



شکل ۳ تصویر میکروسکوپ نوری با رنگ‌آمیزی H&E از بافت اکتوپیک شکل گرفته در مدل اول آندومتریوز: (الف) تصویر غدد شبه آندومتر در ناحیه زیر جلد موش با بزرگنمایی ۱۰۰، (ب، ج) تصویر غدد شبه آندومتر در ناحیه زیر جلد موش با بزرگنمایی ۲۰۰ که در اطراف آن سلول‌های چربی دیده می‌شود. تصویر میکروسکوپ نوری با رنگ‌آمیزی H&E بافت اکتوپیک شکل گرفته در زیر جلد در مدل دوم آندومتریوز با بزرگنمایی ۱۰۰ (ج) تعدادی مقاطع غدد با ترشحات واضح در اطراف رگ خونی نشان داده شده است. همان مقاطع با بزرگنمایی ۲۰۰ (د). فلش سیاه رنگ مقاطع غدد را درون بافت نشان می‌دهد.



شکل ۴ تصویر میکروسکوپ نوری از بافت اکتوپیک مدل اندومتریوز با رنگ آمیزی PAS در مدل اول (الف) و در مدل دوم (ب)؛ همان گونه که در تصاویر واضح است ترشحات این غدد PAS مثبت است.

مدل حیوانی خوب باید بتواند مکانیسم‌های درگیر در بیماری را بیان کند و کارآیی روش‌های درمانی جدید مناسب را نشان دهد. مدل‌های موشی به‌طور گسترده در پژوهش‌های مربوط به اندومتریوز استفاده می‌شود که از مهم‌ترین مزایای آن‌ها می‌توان به هزینه اندک و راحتی کار با آن‌ها اشاره کرد [۱۹].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تکه‌های بافت آندومتر انسان توانایی رشد و بقا در زیر جلد موش را دارد و در تمام موش‌ها ترمیم محل جراحی بسیار خوب انجام شد و کاشت قطعات آندومتر در ناحیه زیر جلد موش با موفقیت در ناحیه ذکر شده انجام گرفت. بافت اکتوپیک تشکیل شده در زیر جلد موش از لحاظ ریخت‌شناسی شبیه غدد آندومتر انسان بود. پیوند تکه‌های بافت آندومتر انسان به ناحیه زیرجلد در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده بود و در این مطالعات نیز مشابه نتایج بررسی حاضر ساختارهای شبه غددی و سلول‌های استرومایی در ناحیه پیوند اکتوپیک و بافت اندومتریوز تشکیل یافته دیده شد [۲۵، ۲۶].

همچنین یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تزریق سلول‌های آندومتر انسان توانایی ایجاد بافت غددی در ناحیه زیر جلد موش را دارد و همچنین توانایی این سلول‌ها در تشکیل بافت غددی در مقایسه با پیوند بافت آندومتر در زیر جلد بیشتر بود و ترشحات غدد ایجاد شده با رنگ آمیزی PAS تأیید شد. بنابراین می‌توان گفت یکی از دلایل اصلی ایجاد

### میانگین تعداد مقاطع غدد در واحد سطح

میانگین تعداد مقاطع غدد در واحد سطح میلی‌متر مربع در مدل اول  $17/18 \pm 57/55$  و در مدل دوم  $77/98 \pm 271/57$  بود. بین این دو مدل اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $P \leq 0/05$ ). و در مدل دوم تعداد این مقاطع بیشتر بود.

### میزان سطح هورمون استروژن در مدل‌های مورد

#### بررسی

میانگین سطح سرمی استروژن در گروه کنترل و مدل اول و دوم به ترتیب  $3/83 \pm 40$  پیکوگرم/ میلی‌لیتر و  $2/48 \pm 49/22$  پیکوگرم/ میلی‌لیتر و  $27 \pm 3/63/32$  پیکوگرم/ میلی‌لیتر بود. بین میانگین سطح سرمی استروژن در دو مدل اول و دوم اندومتریوز و گروه کنترل (موش‌های بدون پیوند در مرحله پرواستروس) و همچنین بین دو مدل اندومتریوز اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) وجود داشت.

#### بحث

اندومتریوز یک بیماری چند عاملی است که پاتوفیزیولوژی پیچیده‌ای دارد و بیشتر جزئیات این بیماری هنوز ناشناخته است؛ بنابراین نیاز به تحقیقات وسیع برای به‌دست آوردن اطلاعات برای پاتوفیزیولوژی این بیماری ضروری است. یک



## سلول‌های جدا شده اندومتر و مدل اندومتريوز

افزایش احتمالاً ناشی از تشکیل بافت غددی بیشتر در این مدل بود. با توجه به مطالعات انجام شده بافت آندومتر اکتویپیک مقدار غیرطبیعی از آنزیم آروماتاز را دارد و این آنزیم مسئول تبدیل آندرواستندین و استرون و تستوسترون به ۱۷ بتا استرادیول است. بنابراین کاشت‌های اندومتريوز قادر است با استفاده از آنزیم آروماتاز به صورت درجا از اندروژن‌های محیط، استروژن بسازد که این امر می‌تواند در افزایش استروژن سرم در مدل دوم در مقایسه با مدل اول به دلیل افزایش تشکیل بافت غددی در مدل دوم مؤثر باشد [۲۷، ۲۸].

نوبل (Nobel) و همکارانش نشان دادند که فعالیت آنزیم آروماتاز در محل کاشت آندومتر در لگن افزایش می‌یابد [۲۸]. فورتن (Fortin) از تحقیق انجام شده خود در سال ۲۰۰۴ نتیجه گرفت که اندازه بافت اکتویپیک ایجاد شده در موش‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده در صورت کاهش استروژن به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد [۲۵].

در مجموع مدل اندومتريوز با به‌کارگیری سلول‌های آندومتر کشت شده موفقیت بیشتری را هم از نظر ریخت-شناسی و سطح غدد شکل گرفته و هم فعالیت استروژنی بالا نشان داد. مطالعات آینده نیاز به تحقیقات بیشتری در زمینه مکانیسم‌های مولکولی درگیر در ایجاد اندومتريوز به دلیل افزایش کیفیت زندگی در بیماران مبتلا به اندومتريوز دارد و به‌کارگیری مدل‌های حیوانی برای یافتن راه‌های درمانی مناسب می‌تواند راهگشا باشد.

## تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد گروه علوم تشریح است که با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و ستاد سلول‌های بنیادی کشور انجام شده است.

اندومتريوز، تکثیر سلول‌های آندومتر است و این سلول‌ها ممکن است در بیماری‌زایی اندومتريوز دخیل باشند و همچنین یافته‌های این مطالعه نشان داد که میزان شکل‌گیری غدد در مدل دوم پیوندی به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از مدل اول پیوندی بود و می‌توان گفت که تعداد بالای این غدد در مدل دوم نسبت به مدل اول احتمالاً به علت تزریق سلول‌های جدا شده و خالص شده آندومتر انسان است و این تئوری را بیشتر تأیید می‌کند که سلول‌های آندومتر که در اثر برگشت خون قاعدگی از مکان طبیعی خود خارج شده یا به‌طور نابه‌جا از طریق متاستاز (Metastasis) توزیع پیدا می‌کنند، ممکن است در بیماری‌زایی اندومتريوز نقش داشته باشند. کرولو (Cervelló) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ پس از جداسازی سلول‌های آندومتر انسان،  $5 \times 10^6$  به ناحیه زیر کپسول کلیه تزریق کردند و پس از تشکیل بافت شبه آندومتر در ناحیه مزبور نشان دادند که بافت تشکیل یافته به تغییرات هورمونی وابسته است و بیان کردند که سلول‌های جدا شده آندومتر انسان توانایی تشکیل بافت و عروق خونی جدید را دارند [۲۳]. محدودیت مطالعات انجام شده به وسیله محققین نامبرده استفاده از ناحیه زیر کپسول کلیه به عنوان محل پیوند است. این در حالی است که در مطالعه حاضر از ناحیه زیرجلدی برای پیوند استفاده شد. در نتیجه با توجه به دسترسی آسان به ناحیه زیر جلد و عدم احتمال خون‌ریزی، عفونت و توانایی بیشتر این سلول‌ها در تشکیل بافت غددی در مقایسه با پیوند تکه‌های آندومتر، این مدل کارایی بیشتر در تحقیقات اندومتريوز دارد و علاوه بر این تعداد سلول کمتری برای ایجاد مدل مورد نیاز است.

در تحقیق حاضر میزان استروژن خون در موش‌ها پس از پیوند افزایش معنی‌داری نسبت به قبل از پیوند داشت و این میزان در مدل دوم نسبت به مدل اول افزایش یافته بود و این

## منابع

[1] Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364(9447): 1789-99.

[2] Holoch KJ, Lessey BA. Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53(2):

- 429-38.
- [3] Schragger S, Falleroni J, Edgoose J. Evaluation and treatment of endometriosis. *Am Fam Physician* 2013; 87(2): 107-13.
- [4] Heller DS, Fitzhugh VA. Abdominal wall endometriosis: a rarely anticipated diagnosis: a 16-year experience and brief literature review. *J Reprod Med* 2014; 59(3-4): 110-2.
- [5] Gui B, Valentini AL, Ninivaggi V, Marino M, Iacobucci M, Bonomo L. Deep pelvic endometriosis: don't forget round ligaments. Review of anatomy, clinical characteristics, and MR imaging features. *Abdom Imaging* 2014; 39(3): 622-32.
- [6] Fedele L, Berlanda N, Corsi C, Gazzano G, Morini M, Vercellini P. Ileocecal endometriosis: clinical and pathogenetic implications of an underdiagnosed condition. *Fertil Steril* 2014; 101(3): 750-3.
- [7] Jubanyik KJ, Comite F. Extrapelvic endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24(2): 411-40.
- [8] Agarwal A, Fong YF. Cutaneous endometriosis. *Singapore Med J* 2008; 49(9): 704-9.
- [9] Fernández-Aceñero MJ, Córdova S. Cutaneous endometriosis: review of 15 cases diagnosed at a single institution. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283(5): 1041-4.
- [10] Brosens I, Benagiano G. Endometriosis, a modern syndrome. *Indian J Med Res* 2011; 133: 581-93.
- [11] Ciarmela P, Critchley H, Christman GM, Reis FM. Pathogenesis of endometriosis and uterine fibroids. *Obstet Gynecol Int* 2013; 2013: 656571.
- [12] Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(5): 261-75.
- [13] Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96(1): 21-34.
- [14] Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42(3): 566-85.
- [15] Wang J, Ma X. Effects of estrogen and progesterin on expression of MMP-2 and TIMP-2 in a nude mouse model of endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2012; 39(2): 229-33.
- [16] Shao R, Cao S, Wang X, Feng Y, Billig H. The elusive and controversial roles of estrogen and progesterone receptors in human endometriosis. *Am J Transl Res* 2014; 6(2): 104-13.
- [17] Beliard A, Noël A, Goffin F, Frankenne F, Foidart JM. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice. *Fertil Steril* 2002; 78(5): 973-8.
- [18] Maia H Jr, Haddad C, Coelho G, Casoy J. Role of inflammation and aromatase expression in the eutopic endometrium and its relationship with the development of endometriosis. *Womens Health (Lond Engl)* 2012; 8(6): 647-58.
- [19] Grümmer R. Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 2006; 12(5): 641-9.
- [20] Mohammadzadeh A, Heidari M, Soltanghorae H, Jeddi-Tehrani M, Ghaffari Novin M, Akhondi MM, Zeraati H, Mohammadzadeh F. Evaluation of the effect of pentoxifylline on white blood cell count in serum and peritoneal fluid in female rats with endometriosis. *J*

- Obstet Gynaecol Res 2008; 34(3): 307-13.
- [21] Grümmer R, Schwarzer F, Balczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. Hum Reprod 2001; 16(8): 1736-43.
- [22] Liu B, Wang NN, Wang ZL, Hong SS, Li JT, Ding HJ, Pan QH, Dong Y, Zhou CQ, Zhuang GL. Improved nude mouse models for green fluorescence human endometriosis. J Obstet Gynaecol Res 2010; 36(6): 1214-21.
- [23] Cervelló I, Mas A, Gil-Sanchis C, Peris L, Faus A, Saunders PT, Critchley HO, Simón C. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. PLoS One 2011; 6(6): e21221.
- [24] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. Biol Reprod 2009; 80(6): 1136-45.
- [25] Fortin M, Lépine M, Merlen Y, Thibeault I, Rancourt C, Gosselin D, Hugo P, Steff AM. Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of endometriosis. Mol Ther 2004; 9(4): 540-7.
- [26] Liu B, Wang NN, Wang ZL, Hong SS, Li JT, Ding HJ, Pan QH, Dong Y, Zhou CQ, Zhuang GL. Improved nude mouse models for green fluorescence human endometriosis. J Obstet Gynaecol Res 2010; 36(6): 1214-21.
- [27] Béliard A, Noël A, Goffin F, Frankenne F, Foidart JM. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice. Fertil Steril 2002; 78(5): 973-8.
- [28] Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, Agarwal VR, Zhao Y, Carr BR, Bulun SE. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82(2): 600-6.