



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



گزارش پیشرفت طرح پژوهشی

عنوان طرح پژوهشی:

ارزیابی ایمنی و اثربخشی تزریق داخل رحمی سلول های بنیادی اندومتر آلوژن مشتق از خون قاعدگی در درمان زنان
دچار شکست مکرر لانه گزینی: کارآزمایی بالینی دوسوکور فاز ۱ و ۲

مجری طرح:

دکتر امیرحسین زرنانی



۱- بیان مسئله	۱۰
۲- روش اجرا: ۱۵	
۲-۱- جمع آوری نمونه و جداسازی سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر	۱۵
۲-۱-۱- انتخاب افراد اهداکننده سلول های بنیادی خون قاعدگی	۱۵
۲-۱-۲- تعداد افراد اهداکننده نمونه خون قاعدگی	۱۵
۲-۱-۳- جمع آوری نمونه خون قاعدگی	۱۵
۲-۱-۴- جداسازی و کشت سلول های بنیادی خون قاعدگی	۱۵
۲-۱-۵- استقرار بانک سلولی برای نگهداری نمونه های سلولی بیماران	۱۶
۲-۱-۶- انتخاب افراد اهداکننده سلول های مزانشیمی اندومتر	۱۸
۲-۲- انتخاب بهترین روش و زمان دسی جوایزیشن از میان روش های تمایزی مختلف	۱۹
۲-۳- انتخاب بهترین مکمل جهت تامین نیاز تغذیه ای و بهبود تمایز سلول ها در روند دسی جوایزیشن	۱۹
مقایسه خصوصیات عملکردی سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی پس از القای دسی جوایزیشن	۲۰
۲-۴- القای دسی جوایزیشن در سلول های بنیادی خون قاعدگی / سلول های مزانشیمی اندومتر	۲۰
۲-۵- تایید کارایی القای دسی جوایزیشن به روش qRT-PCR و الیزا	۲۰
۲-۶- بررسی قدرت دسی جوایزیشن براساس میزان تولید پروتئین پرولاکتین و مقایسه نمونه ها به لحاظ قدرت دسی جوایزیشن	۲۰
۲-۷- بررسی فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های دسی جوایزه	۲۰
۲-۸- بررسی اثر دسی جوایزیشن بر پروفایل متابولیک سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر	۲۱
۲-۹- بررسی اثر عوامل تعدیل کننده پیری (Senomorphic) بر میزان پیری، تولید متابولیت ها، تولید پرولاکتین و تولید سایتوکاین های IL-6 و IL-8 همزمان و یا پیش از القای دسی جوایزیشن	۲۱
فاز بالینی	۲۱
۲-۱۰- انتخاب گروه های مداخله و شاهد براساس معیارهای ورود و خروج در مطالعه	۲۱



۱۱-۲. نحوه تصادفی سازی، تقسیم در گروه های مختلف و کور کردن مطالعه..... ۲۲

۱۲-۲. انتقال سلول های بنیادی خون قاعدگی ۲۲

۱۳-۲. تعیین ایمنی و اقدامات حمایتی پس از تزریق سلول ۲۲

۱۴-۲. پایش بیماران پس از تزریق و تعیین اثربخشی سلول درمانی ۲۲

۱۵-۲. روش جمع آوری داده ها: ۲۳

۱۶-۲. مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن: ۲۳

۱۷-۲. روایی و پایایی ابزار: ۲۳

۱۸-۲. روش محاسبه حجم نمونه و تعداد آن: ۲۳

۱۹-۲. ملاحظات اخلاقی: ۲۳

۲۰-۲. محدودیت های اجرایی طرح و روش کاهش آنها: ۲۳

۲۱-۲. نحوه مقابله با خروج نمونه ها از مطالعه: ۲۳

۲۲-۲. تعریف دقیق پیامد (Outcome) ۲۳

۳- نتایج ۲۵

۱-۳- جمع آوری نمونه خون قاعدگی و نمونه بیوپسی اندومتر ۲۵

۲-۳- کنترل کیفی سلول های بنیادی خون قاعدگی ۲۵

۱-۳-۲- کنترل کیفی عوامل میکروبی ۲۵

۲-۳-۲- تست های ایمونوفلوسینسنت به لحاظ بیان مارکرهای سلول های بنیادی ۲۵

۱-۳-۲-۲- درصد بیان CD34 در سلول های مزانشیمی اندومتر: ۲۶

۲-۳-۲-۲- درصد بیان CD45 در سلول های مزانشیمی اندومتر: ۲۷

۳-۳-۲-۲- درصد بیان CD90 در سلول های مزانشیمی اندومتر ۲۷

۴-۳-۲-۲- درصد بیان CD105 در سلول های مزانشیمی اندومتر: ۲۸

۵-۳-۲-۲- درصد بیان CD34 در سلول های بنیادی خون قاعدگی: ۲۹

۶-۳-۲-۲- درصد بیان CD45 در سلول های بنیادی خون قاعدگی: ۳۰

۷-۳-۲-۲- درصد بیان CD90 در سلول های بنیادی خون قاعدگی: ۳۰

۸-۳-۲-۲- درصد بیان CD105 در سلول های بنیادی خون قاعدگی: ۳۱

۹-۳-۲-۲- درصد بیان CD73 در سلول های بنیادی خون قاعدگی: ۳۲

۳-۳- بهینه سازی تکثیر سلول های بنیادی خون قاعدگی ۳۲



- ۳-۴-تایید دسی جوالیزیشن ۳۳
- ۳-۴-۱-در سطح پروتئین به کمک مارکر پرولاکتین ۳۳
- ۳-۴-۲-در سطح بیان ژن ۳۶
- ۳-۴-۲-۱-سلول مزانشیمی اندومتر ۳۶
- ۳-۴-۲-۲-سلول بنیادی خون قاعدگی ۳۶
- ۳-۴-۳-براساس شاخص circularity ۳۷
- ۳-۵-ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر غلظت گلوکز، لاکتات و پیروات در سلول های مزانشیمی اندومتر ۳۸
- ۳-۵-۱-مقایسه غلظت گلوکز و لاکتات در سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶ پس از تمایز دسی جوالیزیشن ۳۹
- ۳-۶-ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش EPC بر غلظت گلوکز و لاکتات در سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۰
- ۳-۷-ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) در سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۰
- ۳-۸-مقایسه سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) میان سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر ۴۲
- ۳-۹-ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) در سلول های بنیادی خون قاعدگی ۴۳
- ۳-۱۰-مقایسه سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) میان سلول های WD و PD بنیادی خون قاعدگی ۴۳
- ۳-۱۱-ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن بر متابولوم سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۵
- ۳-۱۲-ارزیابی اثر ترکیبات تعدیل کننده پیری (senomorphic) بر دسی جوالیزیشن سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۶
- ۳-۱۳-ارزیابی اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در کلیه سلول های مزانشیمی اندومتر ۵۷
- ۳-۱۴-ارزیابی اثر عوامل senomorphic پروتکل pretreatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در کلیه سوره های سلولی مزانشیمی اندومتر ۶۳



- ۱۵-۳- مقایسه اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر میزان پیری در سورس های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر ۶۴
- ۱۶-۳- ارزیابی اثر عوامل senomorphic پروتکل pretreatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در کلیه سورس های سلولی بنیادی قاعدگی ۶۴
- ۱۷-۳- مقایسه اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر میزان پیری در سورس های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی ۶۶
- ۱۸-۳- ارزیابی اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعدگی ۶۶
- ۱۹-۳- مقایسه اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر غلظت پرولاکتین سلول های WD و PD خون قاعدگی ۶۸
- ۲۰-۳- ارزیابی اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر ۶۹
- ۲۱-۳- مقایسه اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر ۷۰
- ۲۲-۳- مقایسه اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD و PD بنیادی خون قاعدگی ۷۱
- آزمایش های لازم الاجرا در آینده ۷۳

- شکل ۱. مقایسه درصد بیان مارکرهای سلول های بنیادی در سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی ۲۵.....
- شکل ۲. بهینه سازی اثر بیومولکول های بالقوه (افزودنی های کشت) برروی تکثیر سلول های بنیادی خون قاعدگی ۳۳.....
- شکل ۳. غلظت پرولاکتین قبل و بعد از (a) ۳ روز و (b) ۶ روز تمایز دسی جوالیزیشن در سلول های مزانشیمی اندومتر ۳۴.....
- شکل ۴. غلظت پرولاکتین قبل و بعد از (a) ۳ روز و (b) ۶ روز تمایز دسی جوالیزیشن در سلول های بنیادی خون قاعدگی ۳۴.....
- شکل ۵. غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ پس از تمایز به روش EPC در مقایسه با حالت تمایز نیافته ۳۵.....
- شکل ۶. (a) منحنی تکثیر و (b) منحنی نقطه ذوب حاصل از نتایج qRT-PCR سلول مزانشیمی اندومتر ۳۶.....
- شکل ۷. (a) منحنی تکثیر و (b) منحنی نقطه ذوب حاصل از نتایج qRT-PCR سلول بنیادی خون قاعدگی ۳۷.....
- شکل ۸. (a) منحنی تراکم و (b) منحنی مقایسه برآورد میانگین حاشیه ای (Circularity (EMM) در سلول های تمایز یافته و تمایز نیافته ۳۸.....
- شکل ۹. اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر غلظت گلوکز، لاکتات و پیرووات در سلول های مزانشیمی اندومتر ۳۸.....
- شکل ۱۰. مقایسه اثر دسی جوالیزیشن در سورس های سلولی WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر بر غلظت گلوکز و لاکتات در روز ۳ و ۶ پس از تمایز ۳۹.....
- شکل ۱۱. اثر دسی جوالیزیشن به روش EPC بر غلظت گلوکز و لاکتات در روز ۳ تا ۱۲ پس از تمایز در سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۰.....
- شکل ۱۲. اثر دسی جوالیزیشن بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۱.....
- شکل ۱۳. مقایسه اثر دسی جوالیزیشن بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر ۴۲.....
- شکل ۱۴. تصاویر مربوط به رنگ آمیزی senescence در سلول های مزانشیمی اندومتر قبل و بعد از تمایز دسی جوالیزیشن ۴۲.....
- شکل ۱۵. اثر دسی جوالیزیشن بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های بنیادی خون قاعدگی ۴۳.....
- شکل ۱۶. مقایسه اثر دسی جوالیزیشن بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD و PD بنیادی خون قاعدگی ۴۴.....
- شکل ۱۷. تصاویر مربوط به رنگ آمیزی senescence در سلول های بنیادی خون قاعدگی قبل و بعد از تمایز دسی جوالیزیشن ۴۴.....
- شکل ۱۸. نمایش تفاوت متابولیت ها در heatmap در دو گروه سلول های تمایز یافته D (کلاس ۰) و تمایز نیافته uD (کلاس ۱) در روز ۳ پس از تمایز دسی جوالیزیشن ۴۵.....
- شکل ۱۹. نمایش تفاوت متابولیت ها در heatmap در دو گروه سلول های تمایز یافته D (کلاس ۰) و تمایز نیافته uD (کلاس ۱) در روز ۶ پس از تمایز دسی جوالیزیشن ۴۶.....



شکل ۲۰. آزمایش اولیه بر روی اثر زمان تیمار عوامل senomorphic بر روی غلظت پرولاکتین سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۸

شکل ۲۱. آزمایش اولیه بر روی اثر زمان تیمار عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در سورس های PD سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۹

شکل ۲۲. آزمایش اولیه بر روی اثر زمان تیمار عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در سورس های WD سلول های مزانشیمی اندومتر ۴۹

شکل ۲۳. آزمایش اولیه بر روی اثر زمان تیمار عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر ۵۰

شکل ۲۴. آزمایش اولیه درخصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic بر روی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر روز ۳ پس از القای تمایز پروتکل ۲ روز تیمار پیش از شروع تمایز ۵۰

شکل ۲۵. آزمایش اولیه درخصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic بر روی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر روز ۶ پس از القای تمایز پروتکل ۲ روز تیمار پیش از شروع تمایز ۵۱

شکل ۲۶. آزمایش اولیه درخصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic بر روی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر روز ۳ پس از القای تمایز پروتکل ۵ روز تیمار پیش از شروع تمایز ۵۱

شکل ۲۷. آزمایش اولیه درخصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic بر روی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر روز ۳ پس از القای تمایز پروتکل ۵ روز تیمار پیش از شروع تمایز ۵۲

شکل ۲۸. اثر غلظت عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سورس های PD سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ پس از تمایز دسی جوالیزیشن ۵۳

شکل ۲۹. اثر غلظت عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سورس های PD سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۶ پس از تمایز دسی جوالیزیشن ۵۳

شکل ۳۰. مقایسه غلظت پایین و بالای هر عامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن ۵۶

شکل ۳۱. اثر غلظت های انتخابی از عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین کلیه سورس های سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن ۵۷

شکل ۳۲. مقایسه اثر عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سورس های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن ۵۸

شکل ۳۳. اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعدگی ۳ و ۶ روز پس از القای دسی جوالیزیشن ۵۹

شکل ۳۴. مقایسه اثر پروتکل pretreatment با عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سورس های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن ۶۱



- شکل ۳۵. اثر pretreatment عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر..... ۶۴
- شکل ۳۶. مقایسه اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سوره های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر..... ۶۴
- شکل ۳۷. اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های بنیادی خون قاعدگی..... ۶۵
- شکل ۳۸. مقایسه اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سوره های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی..... ۶۶
- شکل ۳۹. اثر پروتکل treatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعدگی در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوآلیزیشن..... ۶۷
- شکل ۴۰. مقایسه اثر treatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعدگی در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوآلیزیشن..... ۶۸
- شکل ۴۱. اثر پروتکل treatment عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر..... ۶۹
- شکل ۴۲. مقایسه پروتکل treatment عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سوره های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر..... ۷۰
- شکل ۴۳. اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری سلول های بنیادی خون قاعدگی..... ۷۱
- شکل ۴۴. مقایسه اثر treatment عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سوره های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی..... ۷۲

۱- بیان مسئله

ناباروری یکی از مهمترین مسائل حوزه تولیدمثل است که به صورت ناتوانی زوجین در فرزندآوری پس از ۱۲ ماه مقاربت جنسی منظم و حفاظت نشده تعریف می شود. تخمین صحیحی از میزان شیوع ناباروری در جوامع در دسترس نیست با این وجود ۱۵٪ زوجین در دنیا و ۲۰٪ زوجین در ایران طبق آخرین بررسی ها در پژوهشگاه ابن سینا نابارور هستند. براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، پنجمین عامل در لیست ناتوانی های جدی در زنان، ناباروری می باشد. پیامدهای ناگواری از جمله تعارضات زناشویی، مشکلات جسمی-روانشناختی، جدایی و پیری جمعیت برای ناباروری گزارش شده که سبب می شود پژوهش ها در این مهم روز به روز افزایش یابد.

از آنجا که ایجاد و حفظ یک حاملگی موفق وابسته به هردو عامل جنین و اندومتر و برهمکنش مناسب این دو با یکدیگر است، شکست در هریک از مراحل پیش و پس از لانه گزینی جنین می تواند منجر به ناباروری شود. علی رغم اهمیت بافت اندومتر در لانه گزینی و باروری موفق، اختلالات لانه گزینی عمدتاً به کاهش ذخیره تخمدان و کیفیت نامناسب جنین نسبت داده می شد. با این وجود، در شکست مکرر لانه گزینی (RIF) که به صورت شکست در حاملگی پس از انتقال حداقل ۴ جنین با کیفیت مناسب در سه سیکل متوالی انتقال جنین شناخته می شود، حتی با وجود انتقال جنین های باکیفیت مناسب، باروری اتفاق نمی افتد. حدوداً ۱۰-۷ درصد از زنانی که تحت درمان IVF قرار می گیرند RIF بدون علت را تجربه خواهند کرد. لانه گزینی هم به خودی خود ضمانتی برای یک حاملگی موفق نیست و پس از لانه گزینی، ممکن است سقط اتفاق بیفتد. این موضوع به اهمیت بافت اندومتر اشاره می کند.

اختلال در عدم بلوغ و آمادگی بافت اندومتر و نیز فاکتورهای ایمنولوژیک موثر بر آن از جمله عوامل موثر بر RIF شناخته می شود که فارغ از علل مرتبط با نقایص کروموزومی جنین می باشد. برای اولین بار در سال ۱۹۵۰، مداوار و پس از آن در ۱۹۵۳، بیلینگهام مطرح کردند که بقای جنین نیمه بیگانه وابسته به تحمل (تولرانس) سلول های ایمنی مادر در برابر ساختارهای آلوآنتی ژنی جنین می باشد و از دست رفتن این مکانیسم های تولرانس ایمنی منجر به ایجاد شرایط پاتولوژیک همچون سقط جنین یا ناباروری خواهد شد. توجه به فاکتورهای ایمنولوژیک نه تنها توجیه کننده برخی از موارد بروز سقط جنین یا ناباروری می باشد، بلکه مشخص شده در مواردی که علت سقط یا ناباروری نقایص ژنتیکی و ترموبوفیلی می باشد نقش فاکتورهای ایمنولوژیک قابل توجه است.

با توجه به اهمیت غیرقابل انکار فاکتورهای ایمنولوژیک در بروز سقط یا ناباروری بی شک طراحی پروتکل های درمانی در جهت اصلاح این فاکتورها می تواند در پیشگیری و درمان خانم های مبتلا حائز اهمیت باشد. ایمونیزاسیون با لنفوسیت های پدری، تزریق داخل وریدی IVIg و تجویز ترکیبات استروئیدی از جمله اقدامات درمانی استفاده شده در بالین می باشند. هر چند این روش های درمانی با موفقیت هایی همراه بودند ولی هیچکدام نتوانستند یک درمان موثر، پایدار و بدون عارضه را در جهت درمان سقط یا ناباروری ارائه نمایند. انتقال عفونت، تولد نوزاد نارس، دیابت حاملگی، آلوایمیون ترومبوسایتوپنی نوزادی، هیپوگلیسمی نوزادی، بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD) و هموراژی مغزی بخشی از عوارض شناخته شده ناشی از درمان های متداول می باشد. بر این اساس، یافتن روش های درمانی جدید که بتواند با عوارض کمتر منجر به درمان موثر و پایدار سقط جنین یا ناباروری گردد از ضرورت های حاضر در جهت حفظ سلامت مادر و جنین می باشد. با توجه به اینکه در سقط جنین یا سایر اختلالات ناباروری از جمله RIF، نقص فاکتورهای مختلف سلولی و ترشحی در از دست رفتن تولرانس ایمنی مادر نسبت به جنین و بروز سقط نقش دارند به نظر می



رسد یافتن روش درمانی که بتواند همزمان موجب اصلاح همه یا بخش زیادی از این فاکتورها گردند، بتواند گزینه مناسب و قابل تأمل باشد.

زمانی که سخن از مکانیسم ها و درمان های ناباروری به میان می آید، عمده توجه ها به سمت بافت های تولیدمثل و درصدر آن ها اندومتر متمرکز می شود. اندومتر یک بافت پویا و منحصر بفرد است که درهرسیکل بطور مداوم درحال تخریب، ترمیم، نوسازی و آماده سازی برای لانه گزینی جنین می باشد. در طول حیات تولیدمثلی یک فرد، اندومتر ۴۰۰ بار دچار بازسازی می شود. بازسازی اندومتر انسان محدود به سیکل های ماهیانه نیست بلکه بعد از زایمان و حتی در زنان یائسه به دنبال تجویز استروژن اتفاق می افتد. اگرچه سیکل استروس موش شامل قاعدگی و بازسازی لایه عملکردی اندومتر نمی شود، ولی موش در طی دوره باروری خود متحمل ۸۰ سیکل استروس می شود که نشان می دهد بازسازی یکی از جنبه های مهم اندومتر در موش نیز می باشد.

در ایجاد و حفظ این خصوصیات، سلول های بنیادی اندومتر نقش بسزایی دارند. از زمان ارایه اولین شواهد مبنی بر حضور سلول های بنیادی در اندومتر حدود ۱۴ سال می گذرد. در این مطالعه، سلول های نادر اپی تلیال و استرومای اندومتر که قدرت کلونوژنیسیته داشتند شرح داده شد. همزمان سلول های (LRC) Label retaining cells با خصوصیت بنیادی در اندومتر موش شرح داده شد. متعاقباً در سال ۲۰۰۷ دومین مقاله در زمینه سلولهای LRC اندومتر موش یافته های مقاله اول را تایید نمود. درغیاب مارکهای اختصاصی، نگهداشت رنگ در درون سلول تنها روش برای شناسایی سلول های بنیادی اندومتر موش بود. این سلول ها هم در جمعیت سلول های اپی تلیالی و هم سلول های استرومال اندومتر قابل شناسایی است. سلول های LRC استرومال CD45 را بیان نمیکنند و لذا از دسته سلول های هماتوپوئیتیک نیستند. در مقابل، این سلول ها مارکهای سلول های بنیادی نظیر Oct-4, c-kit, CD140b, CD146, CD44, CD90 و Sall4 را بیان می کنند.

دسی جوای حاملگی به احتمال قوی حاوی سلول های بنیادی مزانشیمی اندومتر نیز می باشد. سلول های کلونوژنیک در دسی جوای حاملگی سه ماهه اول انسان شناسایی شده اند. سلول های استرومال کشت داده شده دسی جوای سه ماهه اول و دسی جوای سه ماهه آخر انسان خصوصیات سلول های بنیادی مزانشیمی را از خود بروز داده که شامل کلونوژنیسیته، تمایز به رده های مزودرم و بیان مارکهای سطحی مرتبط با سلول های بنیادی است.

سلول های استروما که از این سلول های بنیادی مشتق می شوند همچون سایر سلول های ساکن اندومتر ازجمله سلول های اپیتلیال، اندوتلیال، سلول های ایمنی و glandular در دوره receptivity اندومتر که جنین امکان لانه گزینی و تهاجم را پیدا می کند تحت تاثیر هورمون های جنسی استروژن و پروژسترون که واسطه ایجاد این آمادگی برای اندومتر هستند قرار می گیرند. مواجهه سلول های استروما با این هورمون ها سبب تمایز و تغییر شکل و عملکرد این سلول ها خواهد شد. در طی این فرآیند تمایز که دسی جوالیزیشن نام دارد، سلول های فیبروبلاست دوکی شکل استروما به سلول های اپیتلیالی با خاصیت ترشحی تبدیل می شوند. این فرآیند احتمالاً به این دلیل تکامل یافته است که بافت رحمی را از التهاب بیش از حد و استرس اکسیداتیو همراه با تهاجم تروفوبلاست درگونه هایی همانند انسان و موش که تهاجم تروفوبلاست به بافت عمیق و پیشرونده است محافظت کند. دسی جوالیزیشن همچنین محیط امن و مغذی را برای رشد جنین و تکامل و تهاجم جفت فراهم می کند. دسی جوالیزیشن یک فرآیند ضروری برای لانه گزینی جنین است و بنظر می رسد برهمکنش نامناسب جنین و اندومتر از طریق اختلال در دسی جوالیزیشن توجیهی برای مکانیسم ایجاد



RIF با علت ناشناخته می باشد. این فرایند با تغییرات عمده ای از جمله تغییرات بافتی، سلولی، مارکرهای سلولی، تغییر در رفتار سلول های استروما بویژه سلول های ایمنی و همچنین تغییر در ترانس کریپتوم، سکر توم و متابولوم همراه است.

تغییرات بافتی شامل ادم در استرومای سطحی می باشد که در خلال این فرایند، سیتوپلاسم سلول های استروما افزایش می یابد. در طی فاز تکثیری، سلول های استرومایی اندومتر شبه فیبروبلاستی بوده و دارای شبکه اندوپلاسمی کامل، سیتوپلاسم کم و هسته می باشند. ترانسفورماسیون دسی جوایی هم در شرایط درون تنی و هم برون تنی با گرد شدن هسته، افزایش تعداد هستک، اتساع شبکه اندوپلاسمی خشن و سیستم گلژی و تجمع گلیکوژن و ذرات چربی در سیتوپلاسم همراه است. همچنین سلول های استرومایی دسی جوالیزه دارای پاهای کاذب شده و تعداد فاگوزومها و لیزوزومها افزایش می یابد. این سلول ها همچنین فعالیت فاگوسیتیک از خود نشان می دهند.

دسی جوالیزیشن همچنین با تغییر در مارکرهای سلولی همراه است. مشخصاً درصد سلول های تولید کننده پرولاکتین در دسیجوا افزایش می یابد و میزان تولید پرولاکتین با اندازه سلول های دسیجوالیزه رابطه مستقیم دارد. پرولاکتین رشد و تهاجم سلول های تروفوبلاست را افزایش می دهد. این فاکتور، رگ زایی را تحریک و عملکرد سلول های کشنده طبیعی اندومتر را تعدیل می کند. محصول دوم دسی جوا پروتئین متصل شونده به فاکتور رشد شبه انسولینی (IGFBP1) است. این فاکتور تهاجم سلول های تروفوبلاست را تحریک می کند. LEFTY2 نیز از جمله مارکرهای دسی جوالیزیشن می باشد.

دسی جوالیزیشن همچنین با حضور طیف وسیعی از سلول های ایمنی همراه است. به طور ویژه تعداد سلول های کشنده طبیعی که بالاترین درصد سلول های ایمنی در محیط اندومتر را تشکیل می دهند، افزایش می یابد. این سلول ها وظایف مهمی از جمله کنترل تهاجم سلولهای تروفوبلاست، تغییر آرایش عروق اندومتر، رگ زایی و کمک به رشد جنین ایفا می کنند. سلول های دندریتیک اگرچه جمعیت کوچکی از سلول های ایمنی استروما را به خود اختصاص می دهند ولی نقش موثری در القا تحمل ایمنولوژیک مادر ایفا می کنند. حذف این سلول ها روند دسی جوالیزیشن را مختل کرده و به شکست لانه گزینی در موش منجر می شود. سلول های مرکزی القا تحمل ایمنولوژیک در دسی جوا سلول های T تنظیمی هستند. تعداد این سلول ها با شروع بارداری بطور قابل توجه افزایش می یابد. این سلول ها در کنترل پاسخ های ایمنی مادر بر علیه آنتی ژن های پدر عمل کرده و حذف این سلول ها به شکست لانه گزینی جنین و سقط منجر می شود. این سلول ها با بیان مارکرهاهایی مانند CD4، CD25، FOXP3 و بیان کم CD127 شناسایی می شوند.

دسی جوالیزیشن همچنین با تغییرات بنیادی در بیان ژن ها در سلول های مزانشیمی اندومتر همراه است. مطابق تحقیقات اخیر، القاء دسی جوالیزیشن در سلول های استرومایی با تغییر در بیان بیش از ۳۳۰ ژن همراه است. این تغییرات عمدتاً در ژن های مرتبط با تنظیم سیکل سلولی، بازآرایی اسکلت سلولی، رگ زایی، تعدیل سیستم ایمنی، دفاع بر علیه استرس اکسیداتیو، انتقال یون ها و آب، پاسخ دهی به هورمون های استرویدی، تغییرات پس از ترجمه و مسیرهای انتقال پیام کموکاین ها، سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد اتفاق می افتد.

نتایج پژوهش های اخیر نشان می دهد دسی جوالیزیشن یک فرآیند چندمرحله ای است که به ظهور جمعیت های مختلف سلولی می انجامد. دو جمعیت سلولی دسی جوال با بیان ژن های مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و با فنوتیپ ضدالتهابی و جمعیت

سلولی پیر با ویژگی ترشح فاکتورهای التهابی محصول دسی جوالیزیشن هستند. ایجاد شرایط التهابی موقت توسط سلول های پیر جهت القای دسی جوالیزیشن ضروری به نظر می رسد. لیکن، حضور مداوم این سلول ها بعلت نقص عملکرد سلولهای NK رحمی، سبب پیر شدن سایر سلول های استروما و اختلال در دسی جوالیزیشن خواهد شد. چرا که در شرایط طبیعی، سلول های کشنده طبیعی رحمی که توسط سلول های دسیجوال فراخوانی و فعال می شوند، مسئول برداشت سلول های پیر هستند و از این طریق به پیشبرد دسی جوالیزیشن کمک می کنند.

بنظر می رسد اختلال در دسی جوالیزیشن سلول های مزانشیمی اندومتر عامل مهمی در ایجاد ناباروری و طیفی از مشکلات مرتبط با تولیدمثل باشد. لانه گزینی طی مراحل مختلفی اتفاق می افتد که مراحل ابتدایی آن وابسته به receptivity اندومتر و مراحل میانی و انتهایی آن وابسته به برهمکنش مناسب سلول های تروفوبلاست و اندومتر می باشد. هم receptivity اندومتر و هم این برهمکنش مناسب، وابسته به دسی جوالیزیشن مناسب اندومتر می باشد. کاهش بیان مارکرهای مرتبط با دسی جوالیزیشن و افزایش بیان عواملی که منجر به اختلال در این پدیده می شود در بیماران مبتلا به شکست مکرر لانه گزینی طی مقالات متعدد گزارش شده است. همچنین خارج شدن محتوای ترشحی سلول های استروما از حالت طبیعی طی دسی جوالیزیشن سبب اختلال در لانه گزینی و تکامل بلاستوسیت خواهد شد. در مدل موشی سقط، اختلالات ایمونولوژیک متعددی گزارش شده که اختلال در سلول های ماکروفاژی، فعال شدن سیستم ایمنی، عدم تنظیم سیستم ایمنی موضعی و تولید پایین سیتوکاین های تنظیم کننده ایمنی نظیر $IL-10$ ، $TGF-\beta$ و یا تولید سیتوکاین های سیتوتوکسیک مانند $TNF-\alpha$ ، $IFN-\gamma$ و فعال شدن سیستم کمپلمان در موضع بارداری و کاهش جمعیت سلول های T تنظیمی از این جمله اند. همچنین در این مدل، اختلالات اپی ژنتیک دسی جوا نقش دارد که باتوجه به نقش سلول های دسی جوا در کنترل رفتار سایر سلول ها میتواند توجیه کننده اختلالات ایمونولوژیک نسبت داده شده به سقط باشد.

اگرچه فرآیند دسی جوالیزیشن تحت کنترل فرآیندهای هورمونی و نیز سیگنال های مشتق از خود جنین است ولی مطالعات انجام شده نشان می دهند که پیوند سلول های بنیادی مغز استخوان و نیز سلول های بنیادی اندومتر به رحم رت فرآیند دسی جوالیزیشن را تشدید می کند. نظر به اینکه دسترسی به سلول های بنیادی مستقیماً از بافت اندومتر روشی تهاجمی است، خون قاعدگی که منبع غنی از سلول های بنیادی است در مطالعات استفاده می شود که ملاحظات اخلاقی سختگیرانه جهت دسترسی ندارد و جمع آوری آن کاملاً غیرتهاجمی است. بعلاوه، باتوجه به اهمیت تعداد سلول در سلول درمانی، سرعت تکثیر مناسب و اثرات ایمنومودولاتوری سلول های بنیادی خون قاعدگی، آنها را به ابزارهای سودمندی در درمان بیماری ها تبدیل کرده است.

مطالعات اخیر ما نشان داد که سلول های بنیادی خون قاعدگی ضمن کنترل تکثیر سلولهای NK از کشندگی این سلول ها جلوگیری کرده و با کاهش تولید پرفورین و گرانزیم یک فنوتیپ سازگار با حاملگی در این سلول ها القا میکند. همچنین در مطالعه دیگری که توسط تیم تحقیقاتی ما انجام شد، تزریق داخل رحمی سلول های مزانشیمی دسی جوالیزه موش به موش های ماده مدل سقط (CBA/J) پیش از باردار شدن از موش های نر DBA/2 ضمن طبیعی کردن درصد سقط در این موش ها، درصد سلول های T تنظیمی در غدد درناژکننده رحم را به سطح موش های کنترل می رساند.

سلول های مورد استفاده در این طرح، سلول های بنیادی خون قاعدگی آلوژنیک خواهد بود. سلول های بنیادی از دو منبع اتولوگ و آلوژن قابل تهیه است. از مزایای سلول های بنیادی اتولوگ عدم القای پاسخ های ایمنی است ولی این سلول ها را نمی توان در



زمان مناسب و به تعداد مورد نیاز اخذ نمود. از سوی دیگر شواهدی وجود دارد که در بیماری هایی که نیاز به تزریق سلول های بنیادی وجود دارد، این سلول ها کارآمد نیستند. بعلاوه، اخذ این سلول ها بار مالی سنگینی به همراه دارد. به عنوان مثال سلول های بنیادی افراد مبتلا به لوپوس فاقد عملکرد ایمنومدولاتوری مناسب هستند و در چنین افرادی استفاده از سلول های بنیادی آلوژن نتایج بهتری به همراه داشته است. از سوی دیگر استفاده از سلول های بنیادی آلوژن ارزانتر و با توجه به سالم بودن فرد اهدا کننده عملکرد این سلول ها بهتر است. تنها نگرانی در مورد سلول های بنیادی آلوژن احتمال بروز پاسخ های ایمنی ناخواسته است. این موضوع به طور خاص در بسیاری از مطالعات پیش بالینی و بالینی مورد ارزیابی قرار گرفته است. سلول های بنیادی خواص ایمنومدولاتوری قوی دارند و عمدتاً سبب سرکوب القا پاسخ های ایمنی می شوند. مطابق نتایج حاصله، تزریق سلول های بنیادی آلوژن یا با عدم القای پاسخ های ایمنی و یا القای سطح پایینی از این پاسخ ها همراه است. سلول های بنیادی آلوژن در بسیاری از کارآزمایی های بالینی ثبت شده مورد استفاده قرار گرفته اند. جالب توجه اینکه در بسیاری از مطالعات پیش بالینی و یا بالینی سلول های بنیادی آلوژن مورد استفاده قرار گرفته اند. از سوی دیگر یکی از فرضیه ها در بیماران مبتلا به شکست مکرر لانه گزینی، تعداد کم یا عملکرد نامناسب این سلول ها در رحم است. در این صورت، انتقال اتولوگ این سلول ها احتمالاً موثر نخواهد بود. همچنین القای پاسخ های ایمنی بدنبال تزریق سلول های بنیادی آلوژن عمدتاً بدنبال تزریق سیستمیک این سلول ها رخ می دهد در صورتی که احتمال بروز این پاسخ ها در رحم و نیز در دوره بارداری باتوجه به تولرانس موجود بسیار کمتر خواهد بود.

باتوجه به اهمیت سلول های بنیادی و نقش دسی جوآلیزیشن در روند بیماری زایی بیماران مبتلا به شکست مکرر لانه گزینی، این کارآزمایی بالینی طراحی شد تا پتانسیل تزریق داخل رحمی سلول های بنیادی دسی جوآلیزه در درمان این بیماری در انسان مورد آزمایش قرار گیرد. بعلاوه از آن جا که استفاده از سلول های بنیادی خون قاعدگی در کنترل بیماری روشی غیرتهاجمی به حساب می آید، مقایسه سلول های بنیادی خون قاعدگی با سلول های مزانشیمی جدا شده از بیوپسی اندومتر به لحاظ قدرت دسی جوآلیزیشن و پارامترهای مرتبط با آن ضروری به نظر می رسد که تکمیل کننده این طرح پژوهشی شده است و در پروپوزال اولیه ارسال شده به ستاد این مطالب تکمیلی وجود نداشت.



۲- روش اجرا:

۲-۱- جمع آوری نمونه و جداسازی سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر

۲-۱-۱- انتخاب افراد اهداکننده سلول های بنیادی خون قاعدگی

سن: ۲۰ تا ۳۷ ساله، دارای حداقل یک فرزند سالم، عدم وجود سابقه سقط، عدم وجود عفونت های واژینال، عدم مصرف داروهای محرک تخمدان یا داروهای استروئیدی از ۳ ماه قبل از اهدا، دارای سیکل منظم و عدم وجود تخمدان پلی کیستیک به همراه سندرم متابولیک

سلول ها از افرادی که صرفا داوطلب اهدای سلول های بنیادی خون قاعدگی برای مقاصد پژوهشی هستند اخذ خواهد شد.

جهت فراخوانی افراد داوطلب پیامکی با این مضمون به همکاران مرکز درمان ناباروری ابن سینا ارسال می شود:

"همکار گرامی مرکز درمان ناباروری ابن سینا. از شما جهت همکاری در طرح سل تراپی درمان ناباروری با استفاده از سلول های بنیادی خون قاعدگی دعوت به عمل می آید. شرایط اهدای نمونه خون قاعدگی برای این طرح شامل سن: ۲۰ تا ۳۷ سال، دارا بودن حداقل یک فرزند سالم، عدم وجود سابقه سقط، عدم وجود عفونتهای واژینال، عدم مصرف داروهای محرک تخمدان یا داروهای استروئیدی از ۳ ماه قبل از اهدا، دارا بودن سیکل منظم و عدم وجود تخمدان پلی کیستیک به همراه سندرم متابولیک می باشد. در صورت تمایل و احراز شرایط لازم جهت اهدای نمونه خون قاعدگی خود به خانم قاسمی جهت دریافت و تکمیل فرم رضایت نامه و زمان اهدا مراجعه نمایید. در صورت مشارکت شما از نتایج مطالعه مطلع خواهید شد و هیچ گونه هزینه ای از شما دریافت نمی شود."

۲-۱-۲- تعداد افراد اهداکننده نمونه خون قاعدگی

حداقل از ده فرد واجد شرایط اهدا، نمونه خون قاعدگی اخذ می شود. در صورتی که سلول های فرد اهداکننده از قدرت تمایزی مناسبی برخوردار نباشند افراد جدید جایگزین خواهند شد.

۲-۱-۳- جمع آوری نمونه خون قاعدگی

پس از کسب رضایت آگاهانه و دارا بودن شرایط مطالعه که در فوق ذکر گردید، در روز دوم سیکل قاعدگی، نمونه توسط Diva cup از فرد اهداکننده اخذ شده و پس از جمع آوری و انتقال به لوله فالكون حاوی بافر دارای آنتی بیوتیک و ضد قارچ آمفوتریسین بی (Fungizone) ظرف مدت حداکثر ۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل می شود.

۲-۱-۴- جداسازی و کشت سلول های بنیادی خون قاعدگی

نمونه خون در زیر هود و تحت شرایط استریل پس از عبور از مش با منافذ ۷۰ میکرومتری به کمک محیط کشت سرد جهت آزادسازی سلول های به دام افتاده در لخته در یک لوله فالكون ۵۰ میلی لیتری جمع آوری و سپس سوسپانسیون سلولی در دور ۴۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می گردد. پس از کشت خون قاعدگی، سلول های غیر چسبان



شسته شده و سلول های چسبان پاساژ داده می شوند. هر ۳ روز یکبار محیط کشت سلول ها که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) تعویض می شود.

۵-۱-۲- استقرار بانک سلولی برای نگهداری نمونه های سلولی بیماران

۵-۱-۲-۱- تعریف بانک سلولی: تکثیر و کشت مداوم یک رده سلولی معایب زیادی به دنبال دارد. از جمله:

-خطر آلودگی میکروبی

-از دست دادن ویژگی های مورد نظر در سلول ها (مثلا بیان آنتی ژن های سطحی یا آنتی بادی های مونوکلونال)

-تغییرات و جهش های ژنتیکی

-از دست رفتن یک رده سلولی به علت طول عمر محدود سلول ها

-خطر آلودگی متقابل با سایر نمونه های سلولی

-افزایش مصرف مواد و هزینه های کارکنان

کلیه این عوامل خطر بالقوه را می توان با اجرای یک سیستم بانک سلولی به حداقل رساند. رایج ترین سیستم بانک سلولی، سیستم بانک سلولی چندسطحی است. این نوع سیستم بانکی دو سطحی شامل یک بانک سلولی اصلی (MCB) و یک سیستم بانک سلولی (WCB) working می باشد.

۲-۱-۵-۲- Pre-master Cell bank

در هنگام ورود نمونه اولیه به خط تولید، نمونه جدید را به عنوان یک منبع بالقوه آلودگی در نظر می گیریم چرا که ممکن است انواع آلودگی با باکتری ها، قارچ ها و مایکوپلاسماها را داشته باشد، پس باید تحت شرایط قرنطینه مورد آزمایش قرار گیرد تا اثبات شود که آلودگی میکروبی در آن منفی می باشد. بنابراین هر نمونه وارد شده به خط تولید، پس از تکثیر و پاساژ اولیه، در حدود یک ماه تا زمان مشخص شدن نتایج آزمایشات کنترل کیفیت در تانک ازت تحت شرایط قرنطینه نگه داری می شود که به این بانک Pre-master cell bank گفته می شود.

۳-۱-۵-۳- Master Cell bank

برای هر بیمار تعدادی کرایو ویال (حداقل ۵ ویال) حاوی سلول های پاساژ یک در این بانک سلولی که تحت عنوان بانک سلولی اصلی (M) شناخته می شود نگه داری می شود. این نمونه ها شرایط لازم از نظر آزمایشات کنترل کیفیت را احراز کرده اند و به عنوان ذخیره سلولی اصلی برای هر بیمار نگه داری می شوند.

۴-۱-۵-۴- Working Cell Bank

برای هر بیمار تعدادی از کرایو ویال ها (حداقل ۵ ویال) حاوی سلول های پاساژ یک در این بانک تا زمان درخواست دریافت محصول نگه داری می شوند. کیفیت این سلول ها در آزمایشات کنترل کیفیت تایید شده است و زمانی که نیاز به آزادسازی محصول برای بیمار باشد از سلول های ذخیره شده در این بانک خارج شده و تکثیر می شوند، به بیان دیگر در سطح کار این بانک معادل بانک



توزیع (Bank Cell Distribution) است. کلیه پروسه های بعدی تولید به منظور آزادسازی محصول بر روی سلول های موجود در این بانک صورت می گیرد تا امکان از دست رفتن یا آلودگی سلول های اولیه موجود در MCB به حداقل ممکن برسد.

۵-۱-۲-۵-۵ کنترل کیفی سلول های بنیادی خون قاعدگی

نحوه جداسازی، کشت، کنترل کیفی و ذخیره سازی سلول در بانک مذکور بر اساس الزامات ذخیره شده، با استفاده از تست اندوتوکسین، تست استریلیتی، تست مایکوپلازما مورد بررسی قرار گرفته و دارای شناسنامه HCV، HBV، HIV، HTLV منفی هستند. در تعدادی از نمونه ها به دنبال القای دسی جوالیزیشن، تست کاربوتایپ انجام خواهد شد.

۶-۱-۲-۵-۶ گزارش آزمون های کنترل کیفی جهت ارزیابی Pre-master Cell bank

Safety Tests :

آلودگی باکتریایی و قارچی سلول های پاساژ یک را از طریق آزمون استریلیتی مورد ارزیابی قرار می دهد و نتیجه آزمون استریلیتی نمونه بعد از ۱۴ روز از شروع آزمون گزارش می شود.

Endotoxin: سنجش آلودگی سطح اندوتوکسین در سلول های پاساژ یک گزارش می شود.

Mycoplasma: سنجش آلودگی نمونه ها به مایکوپلازما را از طریق کشت مستقیم سلول ها در دو محیط براث و آگار را بعد از گذشت ۲۸ روز از شروع آزمون و نیز به روش غیرمستقیم PCR گزارش می شود.

مورفولوژی سلول های fibroblast-like در زیر میکروسکوپ بررسی می شود.

برای تعیین فنوتیپ سلول ها، نتیجه بیان مارکرهای سطحی CD73، CD34، CD90 و CD45 به روش فلوسیتومتری بررسی می شود.

جدول : آزمون های کنترل کیفی نمونه های موجود در Pre-master cell bank

تست های کنترل کیفی	روش ارزیابی	معیار پذیرش
تست استریلیتی	باکتری / قارچ	تشخیص داده نشود
مایکوپلازما	کشت	تشخیص داده نشود
مایکوپلازما	PCR	تشخیص داده نشود
اندوتوکسین	تست Gel clot	تشخیص داده نشود
مورفولوژی	مشاهده چشمی / بررسی میکروسکوپی	مورفولوژی دوکی شکل
شمارش سلولی	تریپان بلو	شمارش یک میلیون سلول زنده پس از دفریز کردن
زنده مانی	تریپان بلو	بیش از ۸۰ درصد سلول های بدون رنگ پس از دفریز کردن
Cell recovery	توانایی گسترش مجدد سلول ۲-۳ روز پس از پاساژ دادن	تراکم بیش از ۸۰ درصد
فنوتیپ	فلوسیتومتری	بیان بالای CD90 بیان بالای CD73 بیان بالای CD34

**۷-۵-۱-۲- انتقال نمونه ها از Pre-master Cell Bank به Master Cell Bank و Working Cell Bank:**

در صورتی که نتیجه هر یک از این تست ها قابل قبول نباشد، نمونه قابل استفاده نخواهد بود و باید ویال های نمونه را از بانک قرنطینه خارج کنید. در صورتی که نتیجه آزمون های کنترل کیفیت مورد تایید بود، با رعایت زنجیره سرمایی به وسیله مستر فراستی نیمی از ویال ها (حداقل ۵ ویال ها) را به بانک ازت مربوطه به Master Cell Bank انتقال دهید و نیم دیگر را (حداقل ۵ ویال) به بانک ازت مربوطه به Working Cell Bank انتقال دهید.

۸-۵-۱-۲- نحوه آزادسازی نمونه ها از Working Cell Bank

درخواست تحویل نمونه ها جهت تزریق باید ۱۴-۱۰ روز قبل از تاریخ مورد نظر از طرف پزشک متخصص زنان و زایمان بیمار به بخش پذیرش اعلام گردد و بعد از تایید درخواست پزشک از سوی پذیرش، متعاقباً مسئول فنی واحد تولید را در جریان قرار می دهد.

۱۴-۱۰ روز قبل از تاریخ درخواست شده برای تحویل محصول، بسته به تعداد سلول مورد نیاز برای بیمار، تعداد لازم از ویال های موجود در Working Cell Bank را از بانک ازت مربوطه خارج نموده و ذوب نمایید. پس از فرصت ۲ الی ۳ روزه جهت ریکاوری و تکثیر سلول ها، سلول ها را پاساژ دهید. تعویض محیط مجدد را ۲-۳ روز پس از پاساژ سلولی انجام دهید و محیط رویی سلول ها را در یک لوله فالکون استریل ۱۵ میلی لیتری جمع آوری کنید. از این محیط رویی مطابق روش های اجرایی برای انجام آزمون های استریلیتی و اندوتوکسین نمونه استفاده کنید.

۹-۵-۱-۲- Pooled master and working cell bank

با توجه به اینکه لازم است سلولها یا سکرئوم تزریق شده به بیماران در هر یک از چهار طرح فوق یکسان باشند، لذا ابتدا سلول ها یا سکرئوم تمام اهدا کنندگان در هر طرح با یکدیگر مخلوط و از مخلوط حاصل Pooled master cell bank و Pooled working cell bank تهیه و به روش فوق نگهداری می شود.

۶-۱-۲. انتخاب افراد اهداکننده سلول های مزانشیمی اندومتر

نمونه ها از افراد مراجعه کننده به بیمارستان بهمن به دلایلی غیر از ناباروری، بوسيله بیوپسی، توسط پزشک متخصص تهیه می گردد. این بیماران در محدوده سنی بین ۲۰ تا ۳۷ سال و در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی قرار داشته و به لحاظ دارا بودن عفونت واژینال، داشتن آلودگی با ویروس HBV, HCV و HIV داشتن بیماری های زمینه ای نظیر خودایمنی و اندومتریوز، سابقه کموتراپی، ایمونوتراپی، مصرف کورتیکواستروئیدها و دریافت درمان های هورمونی منفی بودند.

۱-۶-۲. تعداد افراد اهداکننده سلول های مزانشیمی اندومتر

از ده فرد واجد شرایط اهدا، نمونه بافت برداری اخذ می شود. در صورتی که سلول های فرد اهداکننده از قدرت تمایزی مناسبی برخوردار نباشند افراد جدید جایگزین خواهند شد.

۲-۶-۱-۲. جداسازی و کشت سلول های مزانشیمی اندومتر

نمونه ها تحت زنجیره سرد در بافر انتقال حاوی محیط کشت DMEM دارای آنتی بیوتیک و ضد قارچ آمفوتریسین بی یا Fungizone در کوتاهترین زمان ممکن، به آزمایشگاه منتقل می گردند. سپس بلافاصله تحت شرایط استریل زیر هود لامینار داخل پتری دیش استریل با اسکالپل به مدت ۳ الی ۵ دقیقه به صورت مکانیکی هضم گشته و در نهایت در محیط کشت DMEM به همراه دو آنزیم Collagenase با غلظت ۰/۵ mg/mL و DNase با غلظت ۰/۱ mg/mL به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه می گردد. سپس بوسیله هم حجم از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FCS خنثی می گردد. در نهایت سوسپانسیون سلولی در 2×10^6 به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و سلول های ته نشین شده پس از حل شدن در محیط کشت و شمارش، کشت داده شدند.

۲-۲. انتخاب بهترین روش و زمان دسی جوالیزیشن از میان روش های تمایزی مختلف

براساس مقالات مرتبط، روش های مختلفی به منظور القای دسی جوالیزیشن مورد استفاده قرار می گیرند. در ابتدا روشی که بهترین پاسخ یعنی بیشترین میزان پرولاکتین را در سطح بیان ژن و پروتئین در سلول ها متعاقب دسیجوالیزیشن القا می کند، انتخاب شد. این روش ها شامل ترکیب ۰/۵ mM cAMP و ۱ μ M MPA (روش تمایزی PC)، ترکیب ۵۰ μ M cAMP، ۱ μ M MPA و ۱ nM E2 (روش تمایزی EPC) می باشد. سلول ها به مدت ۳ و ۶ روز در روش PC و ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز در روش EPC با این ترکیبات مجاور شده و در نهایت روش PC، به مدت ۴ روز به عنوان بهترین روش تمایزی جهت تمایز سلول ها انتخاب شد.

۲-۳. انتخاب بهترین مکمل جهت تامین نیاز تغذیه ای و بهبود تمایز سلول ها در روند دسی جوالیزیشن

جهت انجام دسی جوالیزیشن بر روی سلول ها نیاز به مکمل غذایی وجود داشت که نه تنها تداخلی با روند دسی جوالیزیشن پیدا نکند بلکه سبب بهبود رشد و تمایز سلول ها شود. لذا مواد مختلفی جهت کشت و تمایز این سلول ها مورد ارزیابی قرار گرفت که شامل آلبومین سرم انسان (HSA) با غلظت ۲ درصد، لیزات پلاکتی (PL) مشتق از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) با غلظت ۲ و ۵ درصد، Hyclone FCS ۱۶ تا ۲۴ هفته که میزان کمی از آنتی بادی و میزان بالینی از فاکتورهای رشد را دارد با غلظت ۲ درصد می باشد که با سرم جنین گاو جذب شده با ذغال فعال (CS-FCS) با غلظت ۲ درصد بعنوان مکمل استاندارد دسی جوالیزیشن مقایسه شد. لازم به ذکر است به علت انتقال پاتوژن های منتقله از حیوان و اثر مداخله گر پروتئین های بیگانه با روند کارآزمایی، اولویت با مکمل هایی است که منشأ حیوانی نداشته باشد. لذا سرم های جایگزین انسانی به جای گاوی اولویت استفاده را دارند.



مقایسه خصوصیات عملکردی سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی پس از القای دسی جوالیزیشن

۴-۲. القای دسی جوالیزیشن در سلول های بنیادی خون قاعدگی / سلول های مزانشیمی اندومتر

پس از بهینه سازی مناسب ترین زمان و روش جهت القای دسی جوالیزیشن، سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر به صورت *in vitro* دسی جوالیزه می شوند. برای این کار سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر در پلیت های کشت ۷۵ کشت شده و دسی جوالیزیشن در آن ها با استفاده از روش تمایزی PC و مکمل بهینه به مدت ۴ روز القا می شوند.

۵-۲. تایید کارایی القای دسی جوالیزیشن به روش qRT-PCR و الایزا

جهت ارزیابی کارایی دسی جوالیزیشن، در روز چهارم پس از القا، سوپ رویی سلولها جهت انجام تست الایزا و تعیین مقدار PRL ترشحاتی برداشته شده و در دمای ۲۰- نگهداری می شود. تست الایزا براساس پروتکل شرکت دیازیست و با 0.2ng/mL LOD انجام می شود.

سپس جهت بررسی بیان ژن های PRL و IGFBP1، پس از لیز سلولی، محتوای RNA استخراج شده و خلوص و غلظت آن با استفاده از دستگاه Nanodrop تعیین میگردد. بعلاوه جهت تعیین Integrity و کیفیت RNA های استخراج شده، نمونه های RNA، بر روی ژل الکتروفورز آگارز Run می گردند. مقدار مورد نیاز از RNA با کیفیتی که تعیین غلظت شده در واکنش RT-PCR به cDNA تبدیل و جهت بررسی بیان ژن های PRL و IGFBP1 و تعیین میزان Fold Change این ژن ها نسبت به ژن خانه دار RPL19 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از روش Real-time PCR مورد استفاده قرار می گیرد.

۶-۲. بررسی قدرت دسی جوالیزیشن براساس میزان تولید پروتئین پرولاکتین و مقایسه نمونه ها به لحاظ قدرت

دسی جوالیزیشن

میزان پرولاکتین تولید شده در سوپ حاصل از کشت سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر دسی جوالیزه با استفاده از کیت به روش ELISA با واحد mIU/mL ارزیابی شد و سلول ها به لحاظ قدرت دسی جوالیزیشن به دو دسته آن هایی که قدرت تمایزی خوبی دارند Well-Decidualized و آن هایی که قدرت تمایزی ضعیفی دارند Poor-decidualized تقسیم شدند.

از کلیه سلول های Well-Decidualized جهت انجام کارآزمایی استفاده شد لذا جهت جبران سلول های Poor-Decidualized مجدداً نمونه خون قاعدگی و نمونه بیوپسی اندومتر از افراد دیگری دریافت و کلیه مراحل فوق تکرار شد تا درنهایت کلیه سلول های مورد استفاده از قدرت دسی جوالیزیشن مناسبی جهت تزریق داخل رحمی برخوردار باشند.

۷-۲. بررسی فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های دسی جوالیزه

به منظور بررسی مکانیسم دسی جوالیزیشن ضعیف در سلول های Poor-Decidualized و ارزیابی ارتباط قدرت دسی جوالیزیشن با درصد حضور سلول های پیر درمجموعه سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر، سنجش فعالیت بتاگالاکتوزیدازی سلول ها به روش رنگ سنجی به کمک کیت رنگ سنجی شرکت Cell Signaling انجام و سپس با میکروسکوپ



معکوس مجهز به سیستم تصویربرداری، تصاویر مربوط به این سلول ها ثبت شد. در کنار این رنگ آمیزی، هسته سلول ها به کمک رنگ DAPI نیز رنگ آمیزی شد تا شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری نسبت به تعداد سلول نرمال شود.

۸-۲. بررسی اثر دسی جوالیزیشن بر پروفایل متابولیک سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر

بدین منظور از ارزیابی غلظت گلوکز و لاکتات جهت بررسی میزان گلیکولیز و از ارزیابی اسیدهای آمینه و سایر متابولیت ها جهت بررسی سایر مسیرهای متابولیکی در سوپ حاصل از کشت سلول های بنیادی خون قاعدگی و سلول های مزانشیمی اندومتر، قبل و بعد از روند دسی جوالیزیشن با استفاده از پروتکل های اشاره شده در مراحل فوق استفاده شد.

۹-۲. بررسی اثر عوامل تعدیل کننده پیری (Senomorphic) بر میزان پیری، تولید متابولیت ها، تولید پرولاکتین و تولید سایتوکاین های IL-6 و IL-8 همزمان و یا پیش از القای دسی جوالیزیشن

از آن جایی که میزان دسی جوالیزیشن با پیری سلول ها در ارتباط است اثر عوامل تعدیل کننده پیری که صرفاً بر رفتار سلول های پیر و نه زنده مانی آن ها اثرگذارند بر تولید پرولاکتین و متابولیت های مرتبط با آن ها مورد بررسی قرار می گیرد. علاوه بر آن جا که سایتوکاین های IL-6 و IL-8 از فرآورده های ترشحی سلول های پیر هستند اثر این عوامل بر تولید این سایتوکاین ها قابل سنجش خواهد بود. بدین منظور طبق مقالات مشابه از دو روش جهت القای اثر عوامل تعدیل کننده پیری از جمله راپامایسین، سیتاگلیپتین، متفورمین، مهارکننده $TGF-\beta$ ، رزوراترول و پردنیزولون بر دسی جوالیزیشن استفاده می شود. یک روش همزمان با القای دسی جوالیزیشن و روش دیگر تیمار سلول ها با این عوامل قبل از القای دسی جوالیزیشن می باشد.

فاز بالینی

۱۰-۲. انتخاب گروه های مداخله و شاهد براساس معیارهای ورود و خروج در مطالعه

افراد گروه مداخله و شاهد از بین افراد مراجعه کننده به کلینیک ناباروری مرکز درمان ناباروری ابن سینا و پس از بررسی های اولیه جهت رد علل شناخته شده ناباروری انتخاب می شوند. گروه مداخله شامل زنان مبتلا به ناباروری است که تزریق داخل رحمی سلول های بنیادی خون قاعدگی را دریافت می کنند. گروه شاهد زنان ناباروری هستند که در داخل رحم آنها بافر فسفات استریل (PBS) به عنوان دارونما تزریق می شود. معیارهای ورود و خروج در هر دو بیماری به شرح ذیل ارائه می گردد.

معیارهای ورود زنان مبتلا به شکست مکرر لانه گزینی: سن بیمار: ۲۰ تا ۳۷ سال، سابقه بارداری نداشته باشند. دارای FSH زیر ۱۰ mIU/mL باشند، تست های عفونی نرمال (HPV, HIV, HBS Ag, HCV, VDRL) باشد.

معیارهای خروج زنان مبتلا به شکست مکرر لانه گزینی: هیدروسالپنکس، اندومتريوز مرحله ۳ و ۴، سندرم آشرمن، بیماری های ارگانیکی اندومتر، اختلالات کروموزومی زوجین، اختلال در اسپرموگرام همسر (DFI بالاتر از ۳۰ درصد و فرم طبیعی اسپرم کمتر از ۲ درصد)، PCO به همراه سندرم متابولیک، آنتی بادی های ضد فسفولیپید، آندومتر نازک، بیماری های سیستم ایمنی از جمله آرتریت روماتوئید، اتوایمنی تیروئید، لوپوس، سابقه ابتلا به سرطان و شیمی درمانی و پرتودرمانی، مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی از جمله کورتیکواستروئیدها در طی سه ماه گذشته، دیابت کنترل نشده

۱۱-۲. نحوه تصادفی سازی، تقسیم در گروه های مختلف و کور کردن مطالعه

در این مطالعه با توجه به اینکه جمعیت خاصی از ناباروری بررسی می شود و معیارهای ورود، عدم ورود و خروج از مطالعه بسیار اختصاصی تعریف شده، بیماران از علت ناباروری مشابه هستند، از این رو تصادفی سازی بلوکی به منظور اختصاص دهی تصادفی بیمار در گروه درمان (A) و گروه شاهد (B) به عنوان روش تصادفی سازی انتخاب می شوند. تصادفی سازی با استفاده از سایت اپ استادی رندومایزر (<http://app.studyrandomizer.com>) انجام می شود. ۴۰ بیمار مبتلا به ناباروری به صورت تصادفی به دو گروه ۲۰ تایی تقسیم می شوند.

در فاز ۱ مطالعه ۵ بیمار وارد مطالعه می شوند. پس از بررسی عوارض و در صورت ایمنی تزریق داخل رحمی این سلول ها، در فاز دوم ۱۵ بیمار دیگر در گروه مداخله وارد مطالعه خواهند شد. مطالعه از نوع دو سو کور است به طوریکه نه بیمار و نه پزشکی که سلول ها را تزریق میکند از ماهیت تزریق مطلع نیستند. فقط مجری اصلی طرح از ماهیت تزریق آگاه است. نمای ظاهری محلول تزریق شده شفاف است و بدین ترتیب از ظاهر ماده تزریقی کسی متوجه ماهیت ماده تزریقی نخواهد شد.

۱۲-۲. انتقال سلول های بنیادی خون قاعدگی

سلول های خون قاعدگی در پاساژ اول یا دوم کشت داده می شوند. سپس سلول ها با تریپسین جدا شده و پس از شمارش در PBS استریل سوسپانسیون شده و غلظت آنها روی دو میلیون سلول در هر میلی لیتر تنظیم می شود. حجم معادل نیم سی سی حاوی یک میلیون سلول بنیادی در روز ۱۶ سیکل، سه تا پنج در مورد جنین cleavage stage 3 و در مورد بلاستوسیست ۵ روز قبل از انتقال جنین با استفاده از کاتتر IUI به ناحیه فوندوس رحم یکبار منتقل می شود. در گروه شاهد بافر PBS در زمان مشابه به صورت داخل رحمی تزریق خواهد شد. بافر PBS یک بافر فیزیولوژیک با pH ۷/۲ است که به عنوان بافر حلال سلول های بنیادی استفاده می شود. این تزریقات در مرکز درمان ناباروری ابن سینا و توسط پزشک متخصص زنان تزریق می شود و تزریق داخل رحمی آن بدون درد است و نیازی به بیهوشی ندارد. بعد از انتقال سلولها ovulation induction انجام می شود.

۱۳-۲. تعیین ایمنی و اقدامات حمایتی پس از تزریق سلول

عوارض احتمالی انتقال سلول از جمله تب، عفونت و واکنش های آلرژیک تا یک هفته پس از انتقال بررسی می گردد. بیماران بسته به نیاز، درمان های لازم از جمله آسپرین و هپارین را دریافت خواهند کرد.

۱۴-۲. پایش بیماران پس از تزریق و تعیین اثربخشی سلول درمانی

با بررسی سونوگرافی ضخامت اندومتر قبل و بعد از انتقال سلول های بنیادی خون قاعدگی سنجیده می شود. هنگامی که ضخامت اندومتر به ۷ میلی متر رسید و نمای سه خطی داشت، جنین های فریز شده منتقل می شود. در بیماران زیر ۳۵ سال ۲ و در زنان بالای ۳۵ سال ۳ جنین ۶ تا ۸ سلولی گرید A منتقل خواهد شد. حمایت فاز لوتئال، با تزریق ۲ آمپول پروژسترون ۴۰ میلی گرم بعد از انتقال جنین انجام خواهد شد. مصرف استرادیول با دوز ۶ میلی گرم در روز ادامه می یابد.

دو هفته پس از انتقال جنین، آزمایش بتا و در هفته ۶ تا ۸ بارداری سونوگرافی انجام می شود. در صورت بارداری، بیمار تا پایان بارداری از نظر پارامترهای بارداری شامل میزان حاملگی بالینی و لانه گزینی مورد بررسی قرار می گیرد. در صورت سقط، محصول بارداری از نظر کاریوتیپ بررسی می گردد.



۱۵-۲. روش جمع آوری داده ها:

جمع آوری داده ها براساس نتایج حاصل از آزمون های بالینی و آزمایشگاهی انجام می پذیرد.

۱۶-۲. مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن:

اطلاعات مورد نیاز از طریق داده های آزمایشگاهی و بالینی طرح تامین خواهد شد. آنالیزهای آماری شامل بررسی تاثیر احتمالی درمان بر پارامترهای بالینی مورد بررسی با استفاده از بسته نرم افزاری Graphpad Prism انجام می شود.

۱۷-۲. روایی و پایایی ابزار:

کلیه تست های آزمایشگاهی استاندارد بوده و دارای اعتبار لازم می باشد. در مواردی که یک ابزار به تنهایی فاقد اعتبار لازم باشد از مجموعه ای از روشهای آزمایشگاهی برای تایید نتایج استفاده می شود. استفاده از کنترل های مختلف میتواند تضمینی برای صحت نتایج بدست آمده فراهم کند.

۱۸-۲. روش محاسبه حجم نمونه و تعداد آن:

طبق نظر مشاور آمار، حجم نمونه برای فاز آزمایشگاهی در هر نوع سلول ۱۰ مورد و برای فاز بالینی ۲۰ بیمار و ۲۰ کنترل خواهد بود.

۱۹-۲. ملاحظات اخلاقی:

نمونه های بیوپسی اندومتر در خلال روند درمان جمع آوری می شود و خاص این طرح نیست. همچنین نمونه های خون قاعدگی روش جمع آوری کاملاً غیرتهاجمی داشته و اهدای آن آسیبی به افراد وارد نمی کند. نمونه بافی کوت هم جزء خون های اهدایی به سازمان انتقال خون می باشد که استفاده ای برای بیماران ندارد. این طرح در کمیته اخلاق پژوهشگاه ابن سینا و سامانه کارآزمایی بالینی ایران تایید و به ثبت رسیده است. کد اخذشده: (IRCT20210513051280N1).

۲۰-۲. محدودیت های اجرایی طرح و روش کاهش آنها:

دشواری در تهیه نمونه های بالینی و نیز مسائل مالی و دسترسی به برخی امکانات آزمایشگاهی، مشکلات پیش آمده در خلال طرح از جمله آلودگی کشت سلولی، عدم دستیابی به تعداد کافی از سلول ها، کشت مجدد و تکثیر سلول ها، از محدودیت های اجرایی طرح میباشد.

۲۱-۲. نحوه مقابله با خروج نمونه ها از مطالعه:

در صورتی که در روند پژوهش فردی از مطالعه خارج شود با فردی با معیارهای مشابه ذکر شده جایگزین خواهد شد.

۲۲-۲. تعریف دقیق پیامد (Outcome)

پیامد اولیه:

نرخ لانه گزینی: پس از گذشت دو هفته از انتقال جنین، از طریق ارزیابی غلظت β -hCG سنجیده خواهد شد.

پیامدهای ثانویه:



نرخ حاملگی بالینی: نسبت تعداد کیسه های جنینی منتقل شده مشاهده شده تو سط اولتراسونوگرافی ۶ هفته پس از انتقال جنین به تعداد کلی جنین های منتقل شده بصورت درصد

۳- نتایج

گزارش نتایج بدست آمده تا این مرحله از طرح:

۳-۱- جمع آوری نمونه خون قاعدگی و نمونه بیوپسی اندومتر

نمونه بیوپسی اندومتر با درنظر گرفتن شرایط ذکر شده در بخش روش ها از ده فرد واجد شرایط و نمونه خون قاعدگی نیز از ۲۰ فرد داوطلب اهدا که واجد معیارهای ورود و خروج ذکر شده در بخش روش ها بودند گرفته شد. سپس با پروتکل ذکر شده سلول های فیبروبلاست از هر دو نمونه جدا شده، و سپس تکثیر و فریز گردید.

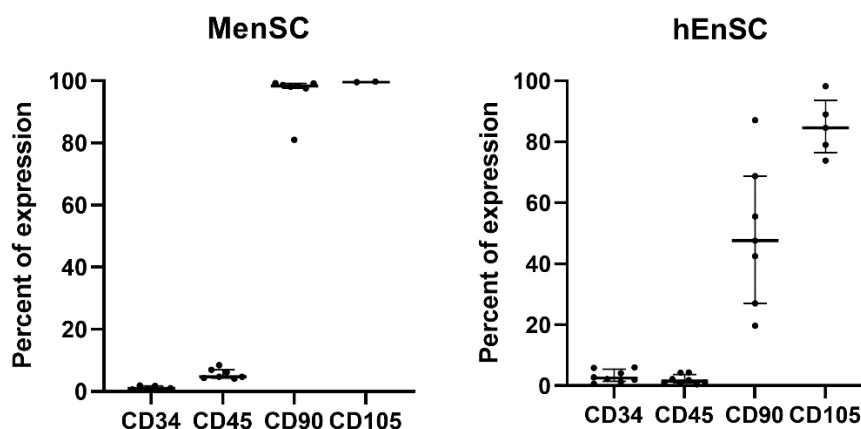
۳-۲- کنترل کیفی سلول های بنیادی خون قاعدگی

۳-۲-۱- کنترل کیفی عوامل میکروبی

سلول های بنیادی خون قاعدگی که قرار است تزریق شوند به لحاظ کلیه تست های کنترل کیفی به روش های مختلف کشت و PCR تایید صلاحیت شدند و عاری از هرگونه عوامل میکروبی اندوتوکسین، مایکوپلاسما و ویروس های HIV, HBS Ag, HCV بودند.

۳-۲-۲- تست های ایمونوفنوتیپ به لحاظ بیان مارکهای سلول های بنیادی

به کمک آنتی بادی علیه مارکهای CD34 (مارکر سلول های خونساز، کونژوگه با FITC)، CD45 (مارکر سلول های ایمنی، کونژوگه با FITC)، و مارکهای سلول های مزانشیمی از قبیل CD73 (کونژوگه با PE)، CD105 (کونژوگه با PE)، CD90 (کونژوگه با FITC)، CD140b (کونژوگه با FITC) و CD146 (کونژوگه با FITC) بیان این مارکها بر سطح سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی به روش فلوسایتومتری بررسی شد.



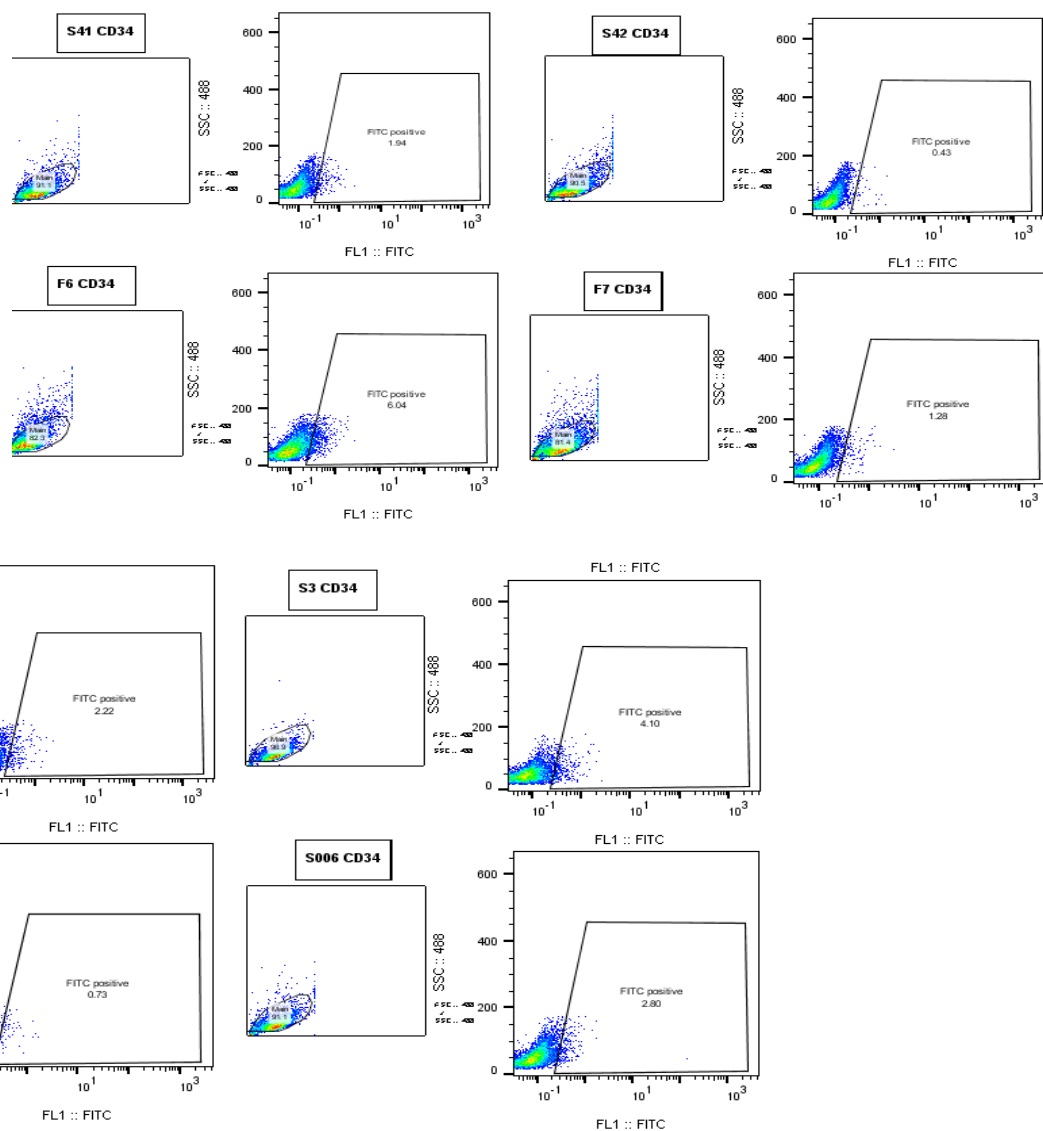
شکل ۱. مقایسه درصد بیان مارکهای سلول های بنیادی در سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خ

بطور کلی نتایج نشان می دهد که هم در سلول های مزانشیمی اندومتر و هم در سلول های بنیادی خون قاعدگی بیان مارکهای CD34 و CD45 نزدیک به صفر هست اما در هر دو نوع سلول مارکهای مربوط به سلول های بنیادی CD90 و CD105 بیان بالایی دارند.

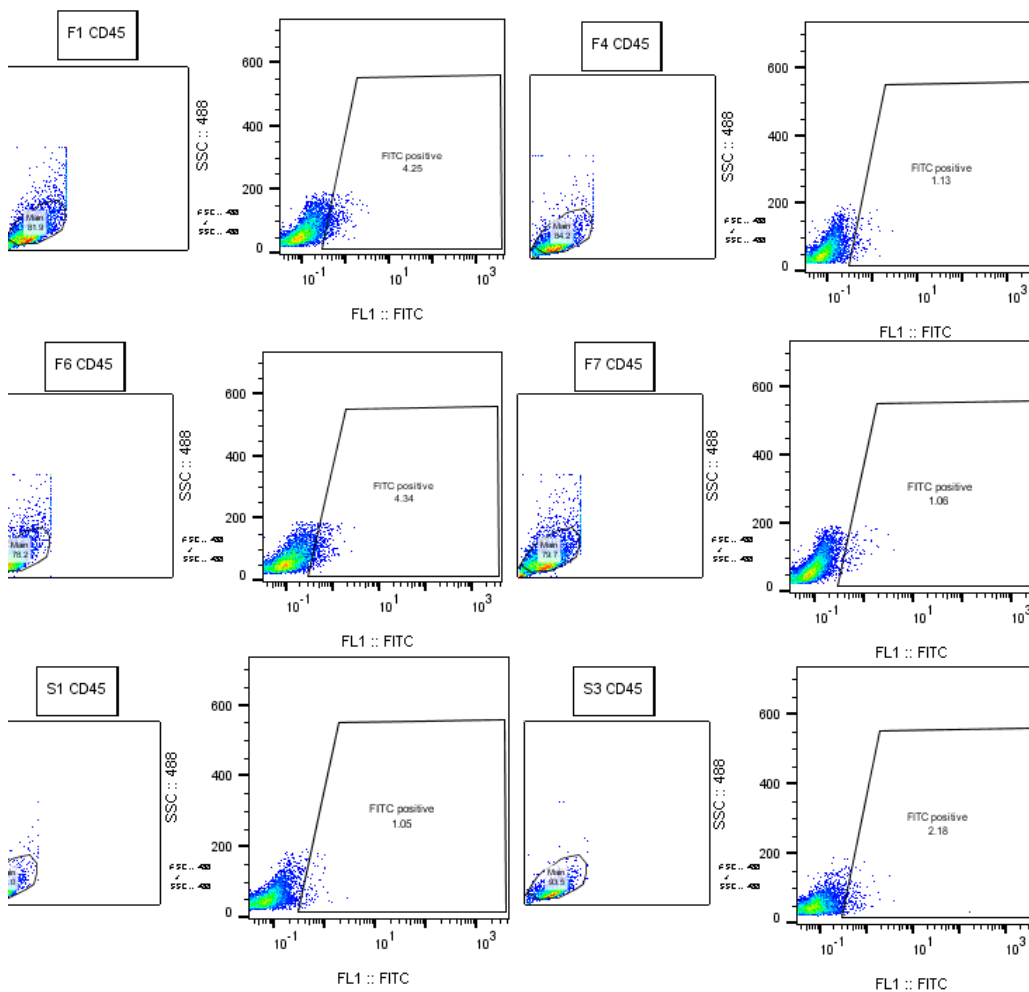


نتایج مربوط به درصد بیان مارکر در هر دو نوع سلول با جزئیات بیشتر در نمودارهای فلوسایتومتری به شرح ذیل در دسترس است.

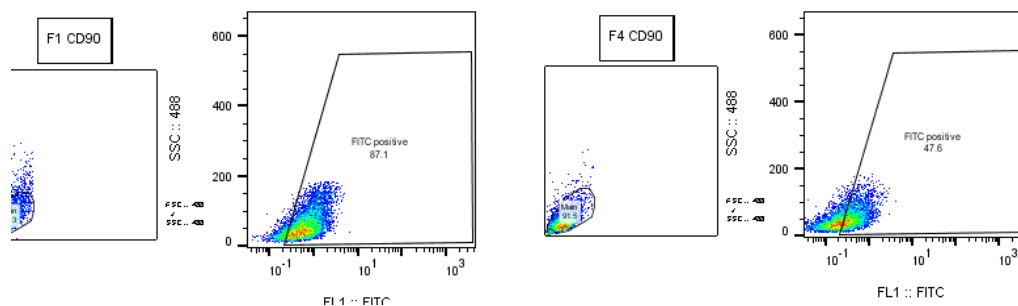
۱-۲-۳- درصد بیان CD34 در سلول های مزانشیمی اندومتر:

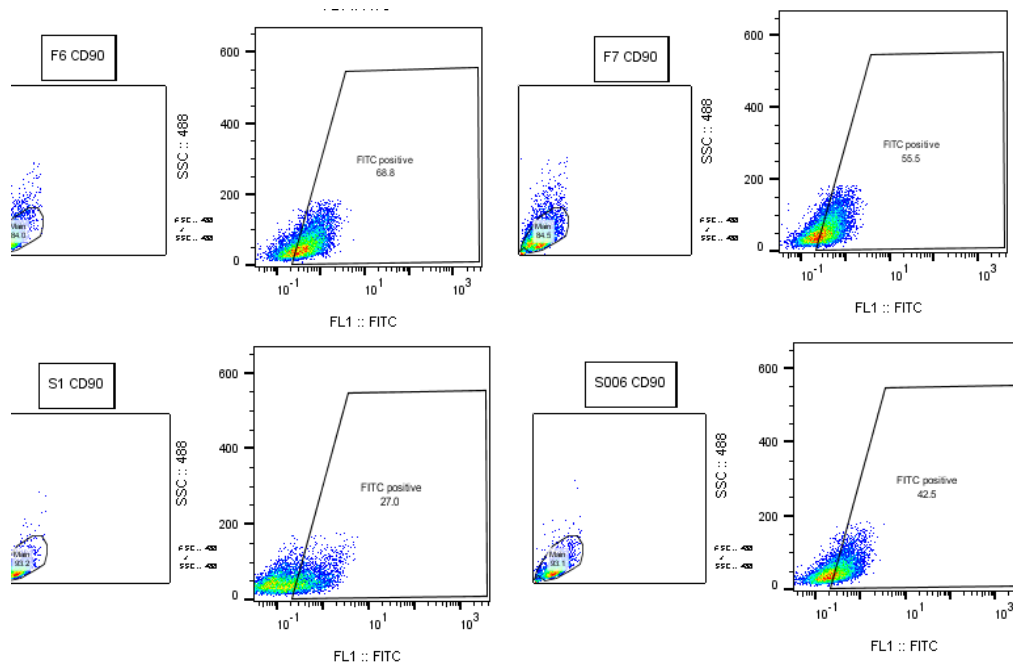


۳-۲-۲-۲-درصد بیان CD45 در سلول های مزانشیمی اندومتر:

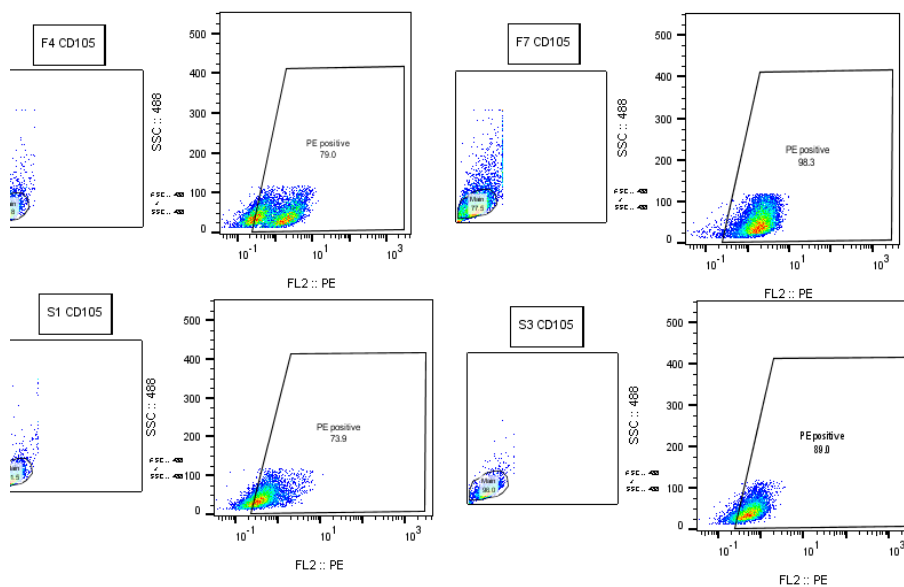


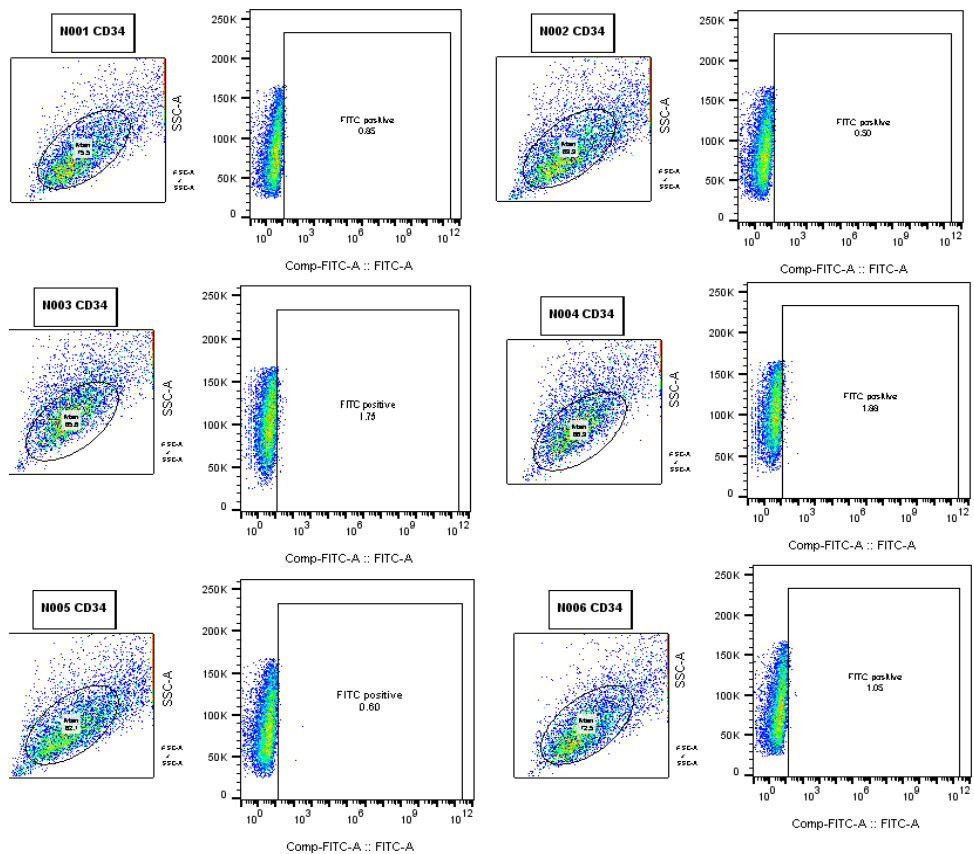
۳-۲-۲-۳-درصد بیان CD90 در سلول های مزانشیمی اندومتر





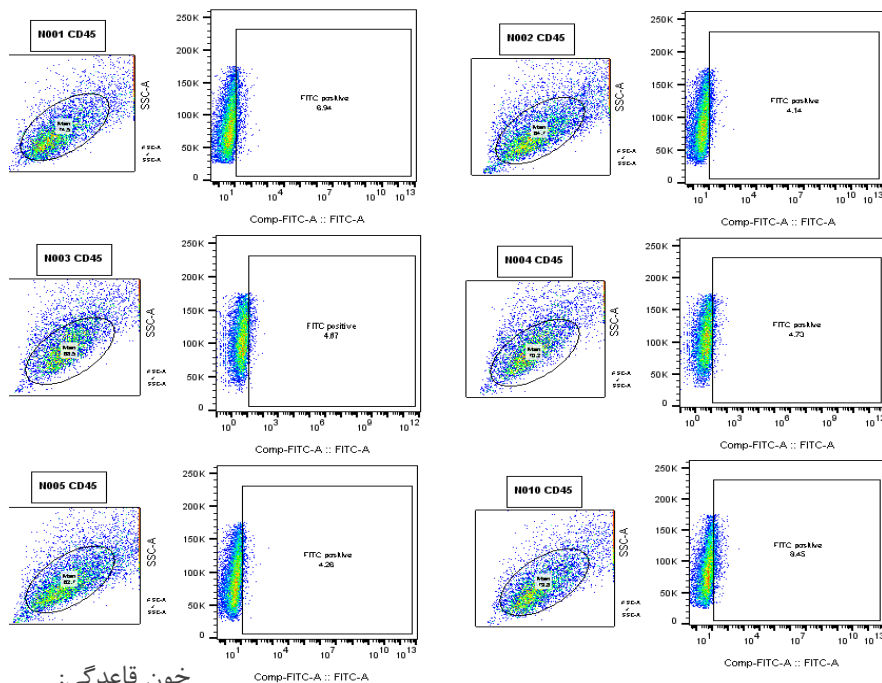
۴-۲-۳-درصد بیان CD105 در سلول های مزانشیمی اندومتر:







۶-۲-۳-درصد بیان CD45 در سلول های بنیادی خون قاعدگی:

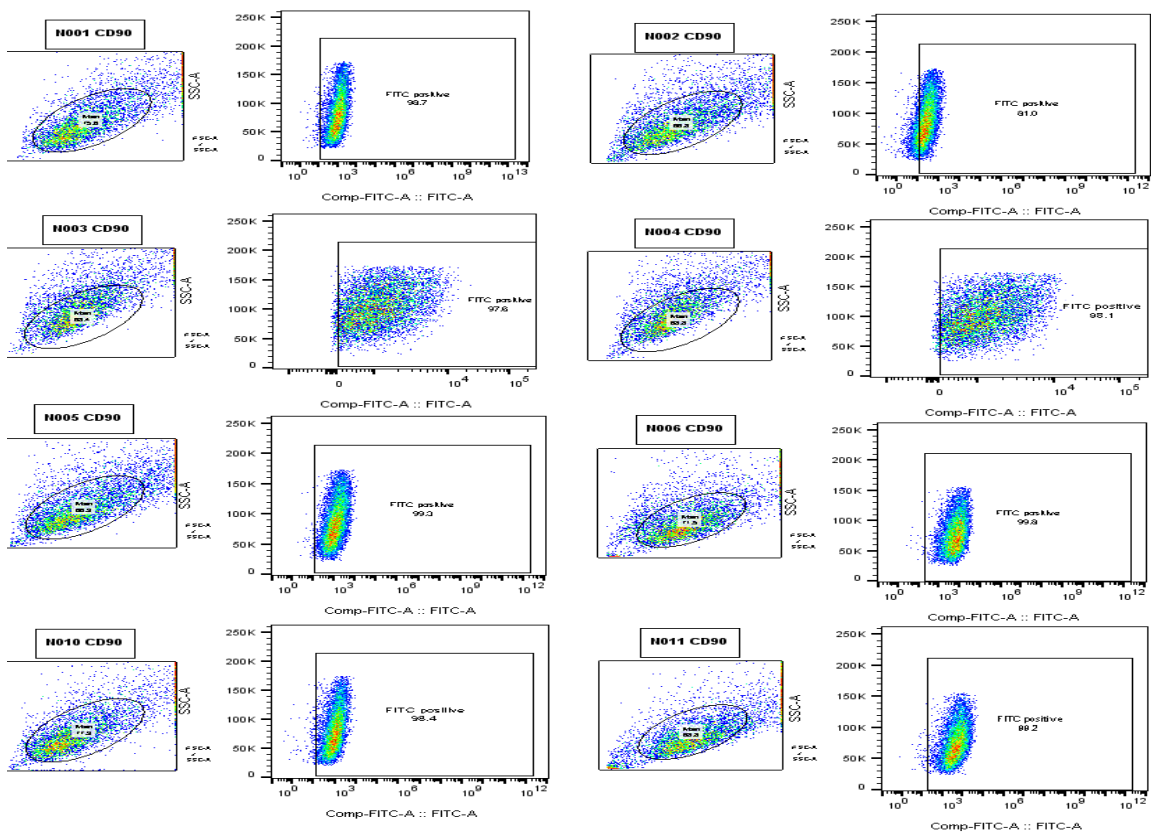


در CD90

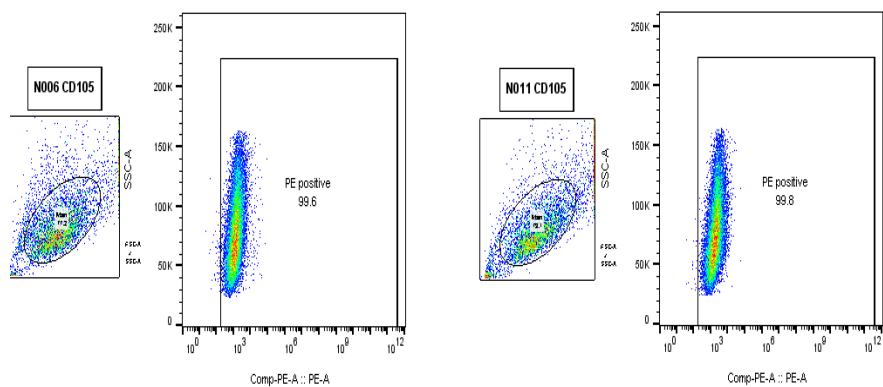
خون قاعدگی:

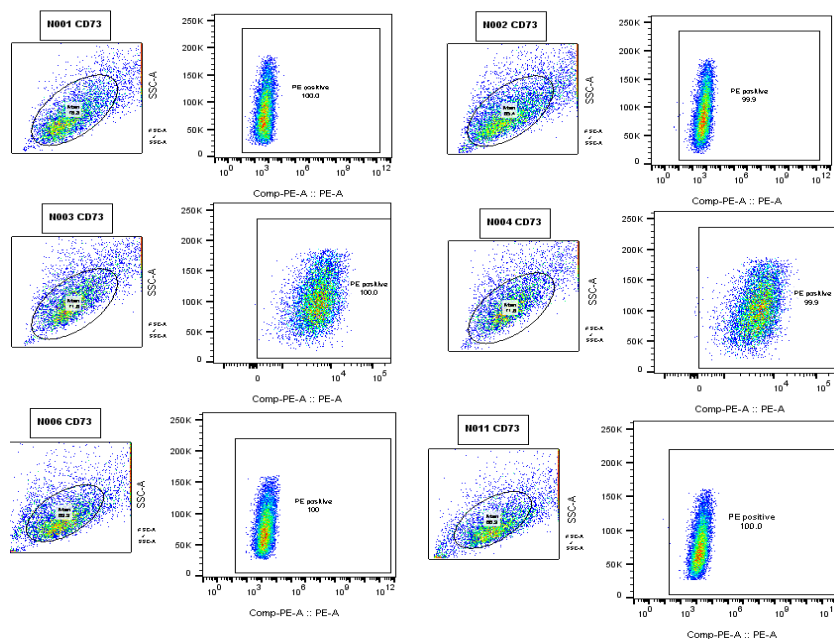
۷-۲-۳-درصد بیان

سلول های بنیادی



۸-۲-۳- درصد بیان CD105 در سلول های بنیادی خون قاعدگی:



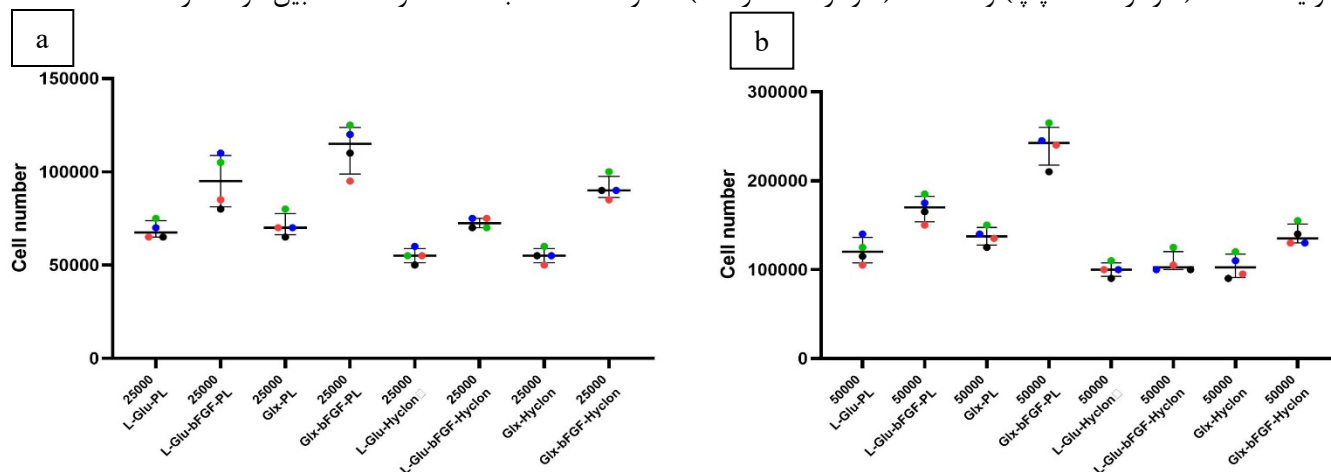


۳-۳- بهینه سازی تکثیر سلول های بنیادی خون قاعدگی

به منظور بهینه سازی تکثیر این سلول ها بویژه سلول های بنیادی خون قاعدگی که جهت انجام سلول درمانی نیاز به تعداد زیادی از آن ها بود تست بهینه سازی تکثیر با استفاده از ترکیبات زیر در دو تعداد سلول اولیه ۲۵۰۰۰ و ۵۰۰۰۰ انجام شد:

۱. L-گلوتامین و لیفات پلاکتی (PL)
۲. L-گلوتامین و bFGF (فاکتور رشد مشتق از فیبروبلاست) و PL
۳. گلوتامکس (دی پپتید L-گلوتامین و L-آلانین) و PL
۴. گلوتامکس و bFGF و PL
۵. L-گلوتامین و Hyclone (مخلوطی از چندین سرم جنین گاوی (FCS) که دارای مقادیر کمتری آنتی بادی و مقادیر بالای فاکتور رشد است)
۶. L-گلوتامین و bFGF و Hyclone
۷. گلوتامکس و Hyclone
۸. گلوتامکس و bFGF و Hyclone

همان گونه که در نمودار زیر قابل مشاهده است، اگرچه مقیاس تعداد سلول های تکثیر یافته در دو گروه با تعداد سلول اولیه ۲۵۰۰۰ (نمودار سمت چپ) و ۵۰۰۰۰ (نمودار سمت راست) متفاوت است که به علت تفاوت تعداد بین دو مقدار



شکل ۲. بهینه سازی اثر بیومولکول های بالقوه (افزودنی های کشت) بر روی تکثیر سلول های بنیادی خون قاعدگی

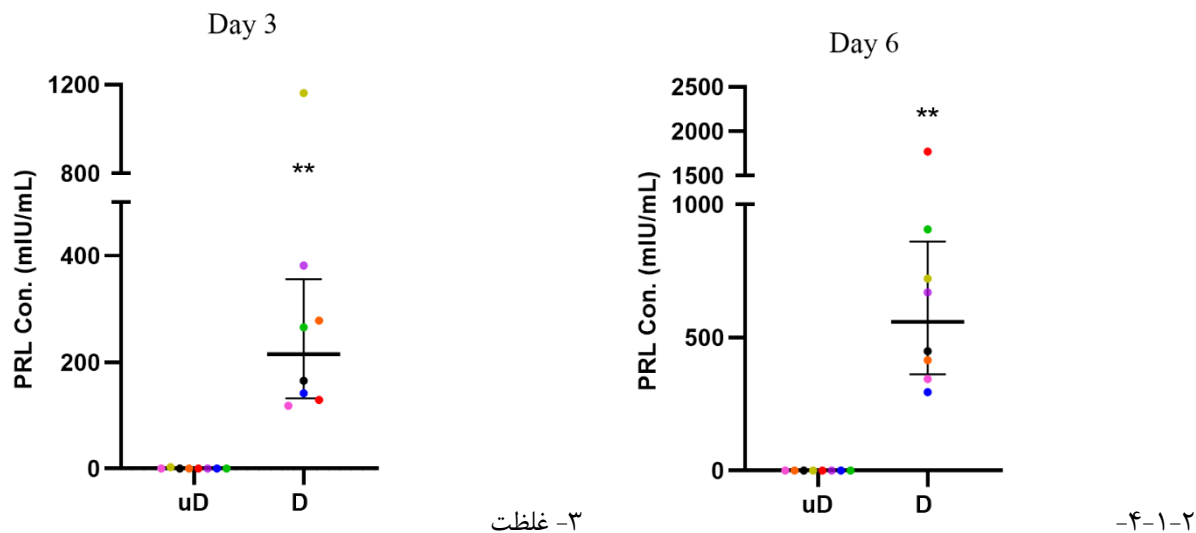
(a) تعداد سلول اولیه ۲۵۰۰۰ (b) تعداد سلول اولیه ۵۰۰۰۰

امری طبیعی و بدیهی به نظر می رسد، لیکن نتایج در هردو تعداد نشان می دهد که ترکیب گلو تامکس و bFGF چه همراه با مکمل PL و چه همراه با مکمل Hyclone بهترین روش جهت افزایش تکثیر سلول ها می باشد.

۳-۴- تایید دسی جوالیزیشن

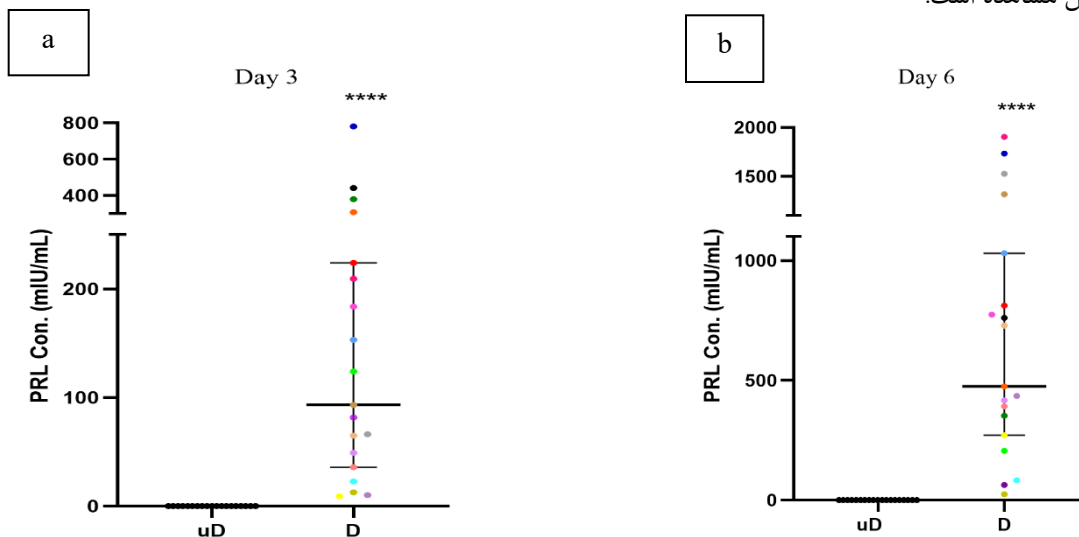
۳-۴-۱- در سطح پروتئین به کمک مارکر پرولاکتین

۳-۴-۱-۱- غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر ۳ و ۶ روز پس از القای دسی جوالیزیشن به روش PC پس از خالص سازی سلول های مزانشیمی اندومتر در کشت سلول از بیوپسی های اندومتر جداسازی شده، این سلول ها در پلیت ۲۴ خانه به تعداد ۱۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هرچاهک کشت داده شدند تا به روش PC تمایز دسی جوالیزیشن در آن ها القا گردد. براساس مقالات معتبر، روش القای به PC به این صورت است که پس از کاشت این تعداد سلول در پلیت، زمان لازم است که سلول ها تکثیر یافته و به ۷۰ تا ۸۰ درصد تراکم (confluency) برسند. سپس جهت حذف عوامل هورمونی، محیط کشت فاقد فنول رد ۲٪ به همراه سرم جنین گاوی جذب شده با ذغال فعال (CS-FCS) به مدت یک شب به آن ها افزوده می شود. سپس همانطور که در قسمت روش ها توضیح داده شد محیط تمایزی PC که حاوی ۰.۵mM cAMP و ۱uM MPA است به سلول ها افزوده می شود. در روز ۳ پس از القا، نیمی از سوپ رویی محیط کشت برداشته شده و به اندازه نصف حجم محیط کشت از محیط تمایزی تازه به آن ها اضافه می شود تا کل سوپ سلولی در روز ۶ پس از القا جمع آوری شود. سپس به کمک کیت الایزا، غلظت پرولاکتین موجود در سوپ رویی کشت سلول ها ارزیابی می شود. نمودارهای زیر غلظت پرولاکتین حاصل از ۹ سلول مزانشیمی اندومتر مختلف در روز ۳ و ۶ روز پس از القای دسی جوالیزیشن را نمایش می دهد.



شکل ۳. غلظت پرولاکتین قبل و بعد از (a) ۳ روز و (b) ۶ روز تمایز دسی جوالیزیشن در سلول های مزانشیمی های بنیادی خون قاعدگی ۳ و ۶ روز پس از نتایج در روز ۳ و ۶ با $p\text{ val} = 0.0078$ معنی دار گزارش شده اند. منظور از D گروه تمایز یافته و منظور از uD گروه تلقای دسی جوالیزیشن به می باشد. روش PC

به منظور مقایسه میزان پرولاکتین تولید شده در سلول های بنیادی خون قاعدگی پس از القای دسی جوالیزیشن، این سلول ها نیز به روش بالا تمایز یافتند و نمودارهای حاصل از ارزیابی غلظت پرولاکتین در این سلول ها که از ۲۰ سورتس مختلف سلولی ارزیابی شدند در زیر قابل مشاهده است:

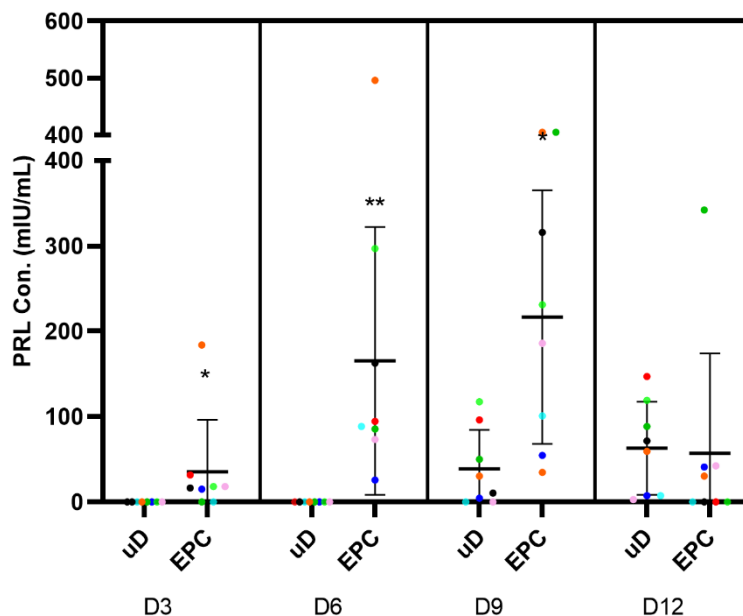


شکل ۴. غلظت پرولاکتین قبل و بعد از (a) ۳ روز و (b) ۶ روز تمایز دسی جوالیزیشن در سلول های بنیادی خون قاعدگی

همانطور که از نمودارهای بالا قابل

استناد است اگرچه میانه میزان پرولاکتین در سلول های بنیادی خون قاعدگی در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن از سلول های مزانشیمی اندومتر کمتر است که این امری بدیهی به نظر می رسد چرا که سلول های بنیادی خون قاعدگی مخلوطی از سلول های دسی جوال و سلول های پیر هستند که از بدن خارج شده اند، اما فراوانی سلول هایی که تولید قابل توجهی از پرولاکتین را دارند یعنی سلول های با تمایز خوب (Well-decidualized) در میان سلول های بنیادی خون قاعدگی کم نیست و این موضوع ما را به کفایت سلول های بنیادی خون قاعدگی در امر دسی جوالیزیشن درمقایسه با سلول های مزانشیمی اندومتر و جایگزینی برای این سلول ها امیدوار می کند.

۳-۴-۱-۳- غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ تا ۱۲ پس از القای دسی جوالیزیشن به روش EPC به منظور مقایسه روش PC و EPC و تایید کارایی روش PC در القای دسی جوالیزیشن، سلول های مزانشیمی اندومتر به روش EPC (50uM cAMP, 1uM MPA, 10nM E2) تمایز یافتند و در روز ۳، ۶، ۹ پس از القا نیمی از سوپ رویی کشت این سلول ها جمع آوری شد تا با نیمی از حجم محیط کشت تازه تمایزی جایگزین شود و در روز ۱۲ پس از القا کل حجم سوپ جمع آوری و میزان پرولاکتین موجود در آن به روش الایزا ارزیابی شد. نمودار زیر روند افزایش غلظت پرولاکتین را نمایش می دهد:



شکل ۵. غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ پس از تمایز به روش EPC در مقایسه با حالت تمایز

در روز ۳ پس از تمایز $p\text{ val} = 0.0313$ ، در روز ۶ پس از تمایز $p\text{ val} = 0.0078$ ، در روز ۹ پس از تمایز $p\text{ val} = 0.0234$ می باشد. در روز ۱۲ تفاوت گروه تمایز یافته و تمایز نیافته معنی دار نیست.

۳-۴-۱-۴- غلظت پرولاکتین در سلول های بنیادی خون قاعدگی در روز ۳ تا ۱۲ پس از القای دسی جوالیزیشن به روش EPC با هدف فوق و به منظور مقایسه با سلول های مزانشیمی اندومتر، کارایی دسی جوالیزیشن به روش EPC در سلول های بنیادی خون قاعدگی نیز از طریق ارزیابی غلظت پرولاکتین سنجیده شد. اما سلول های بنیادی خون قاعدگی به روش EPC تولیدی از پرولاکتین از خود نشان ندادند.

لذا روش EPC روش مناسبی جهت القای دسی جوالیزیشن در سلول های بنیادی خون قاعدگی نمی باشد.

۳-۴-۲-۲ در سطح بیان ژن

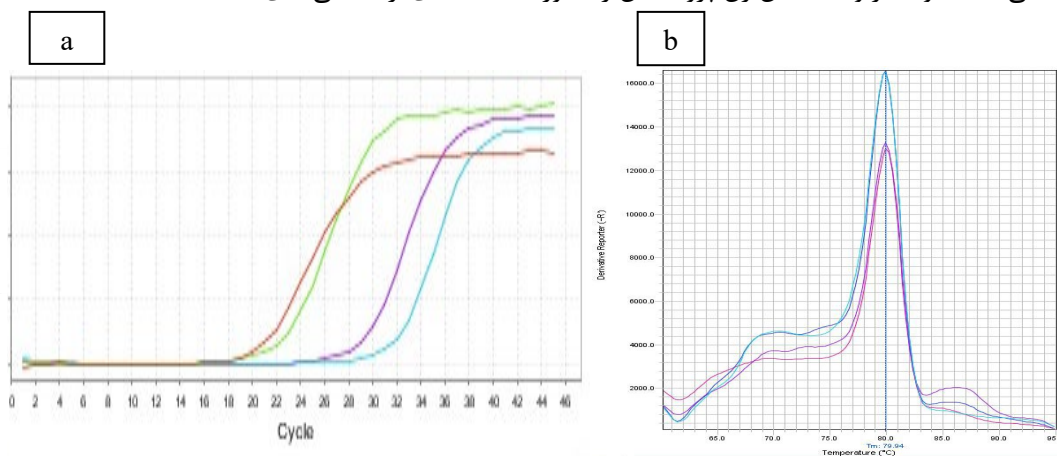
براساس مقالات، تایید دسی جوالیزیشن علاوه بر اندازه گیری غلظت پرولاکتین در سطح پروتئین، اندازه گیری میزان mRNA ژن پرولاکتین و IGFBP1 به روش qRT-PCR می باشد که شدت تغییرات بیان (Fold Change) نسبت به گروه کنترل براساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارائه شده توسط Livak و Schmittgen آنالیز می شود.

۳-۴-۲-۱ سلول مزانشیمی اندومتر

بصورت میانگین در سلول های مزانشیمی اندومتر پس از دسی جوالیزیشن ۳۴۰ برابر افزایش در بیان PRL و ۱۴۹۷۲ برابر افزایش در بیان IGFBP1 خواهیم داشت.

بدیهی است که هرچه میزان تغییرات بیان ژن هر مارکر نسبت به گروه کنترل بالاتر باشد نشانه تمایز مناسب آن سورس در سطح بیان ژن می باشد.

تصاویر زیر منحنی تکثیر و منحنی نقطه ذوب مربوط به بیان ژن پرولاکتین را بصورت نماینده ای از منحنی های بدست آمده حاصل نشان می دهد.



شکل ۶. (a) منحنی تکثیر و (b) منحنی نقطه ذوب حاصل از نتایج qRT-PCR سلول مزانشیمی اندومتر

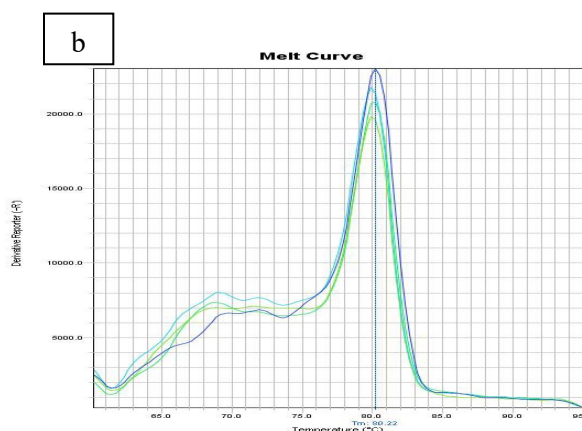
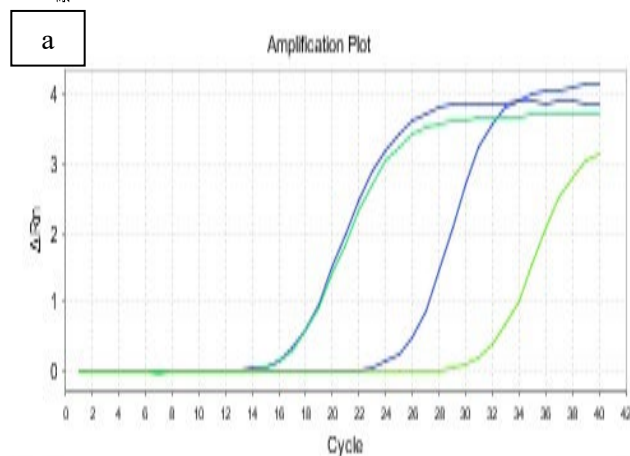
۳-۴-۲-۲ سلول

تصاویر خروجی دستگاه Stepone plus Real-time PCR می باشد

بنیادی خون قاعدگی

بصورت میانگین در سلول های بنیادی خون قاعدگی ۱۶۸ برابر افزایش در بیان PRL و ۱۰۰۱۵ برابر افزایش در بیان IGFBP1 خواهیم داشت.

و تصاویر منحنی تکثیر و منحنی نقطه ذوب آن بصورت زیر قابل ارائه است:



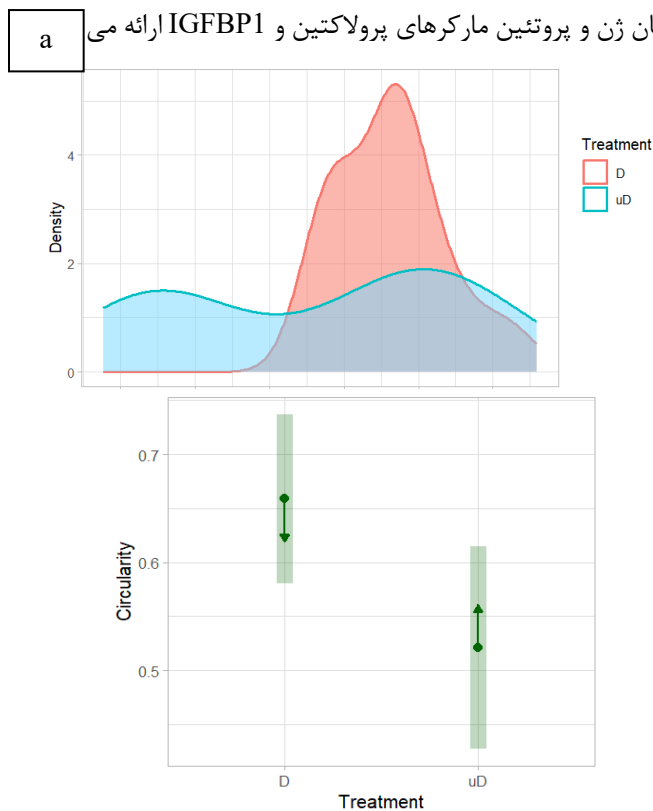
۳-۴-۳- براساس شاخص circularity

شکل ۷. (a) منحنی تکثیر و (b) منحنی نقطه ذوب حاصل از نتایج qRT-PCR سلول بنیادی خون قاعدگی

تصاویر خروجی دستگاه Stepone plus Real-time PCR می باشد

براساس مقاله ای که در سال ۲۰۲۳ در مجله Current protocols منتشر شد، تغییر در مورفولوژی سلول های تمایز نیافته نسبت

به سلول های تمایز نیافته است که شاخص جامعتری نسبت به ارزیابی بیان ژن و پروتئین مارکرهای پرولاکتین و IGFBP1 ارائه می



کند. ما علاوه بر ارزیابی های فوق، شاخص circularity سلول های تمایز نیافته و تمایز نیافته را براساس روش پیشنهادی در این مقاله محاسبه کردیم که نتایج آن در تصاویر زیر قابل ارائه می باشد. لازم به ذکر است نتایج زیر مربوط به سلول های مزانشیمی اندومتر بوده و نتایج مربوط به سلول های بنیادی خون قاعدگی در گزارش نهایی طرح ارائه خواهد شد.

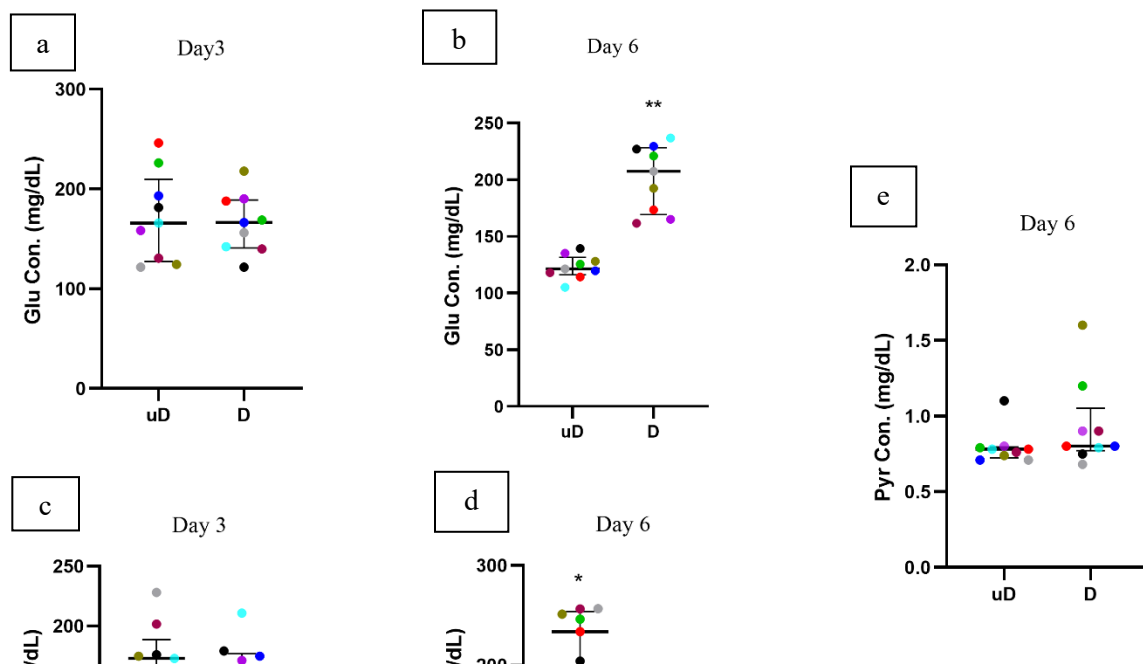
شکل ۸. (a) منحنی تراکم و (b) منحنی مقایسه برآورد میانگین حاشیه ای (Circularity (EMM) در سلول های تمایز یافته و تمایز نیافته

D نشان دهنده گروه تمایز یافته و uD نشان دهنده گروه تمایز نیافته می باشد

محاسبه شاخص circularity در این مقاله براین اساس است که ابتدا مرز غشای سلول ها در تصاویر حاصل از میکروسکوپ نوری توسط کاربر مشخص می شود. سپس براساس یک مدل خطی، اثر تیمار سلول ها و میزان circularity محاسبه شده با نرم افزار ImageJ تحت عنوان شاخص میانگین حاشیه ای (EMM) برآورد می شود و در نمودار نمایش داده می شود.

همان گونه که در شکل 6b مشخص است، چنان چه پیکان های مقایسه ای در دو گروه تیمار شده و نشده با هم هم پوشانی نداشته باشند شاخص circularity در دو گروه بصورت معنی داری با یکدیگر متفاوت است.

۵-۳- ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر غلظت گلوکز، لاکتات و پیرووات در سلول های مزانشیمی اندومتر به منظور ارزیابی وضعیت گلیکولیز بی هوازی در دسی جوالیزیشن سلول های مزانشیمی اندومتر، سوپ سلول ها پس از روز ۳ و ۶ از القای دسی جوالیزیشن جمع آوری و غلظت گلوکز به عنوان واکنش دهنده و پیرووات و لاکتات به عنوان فرآورده سنجیده شد.



شکل ۹. اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر غلظت گلوکز، لاکتات و پیرووات در سلول های مزانشیمی اندومتر

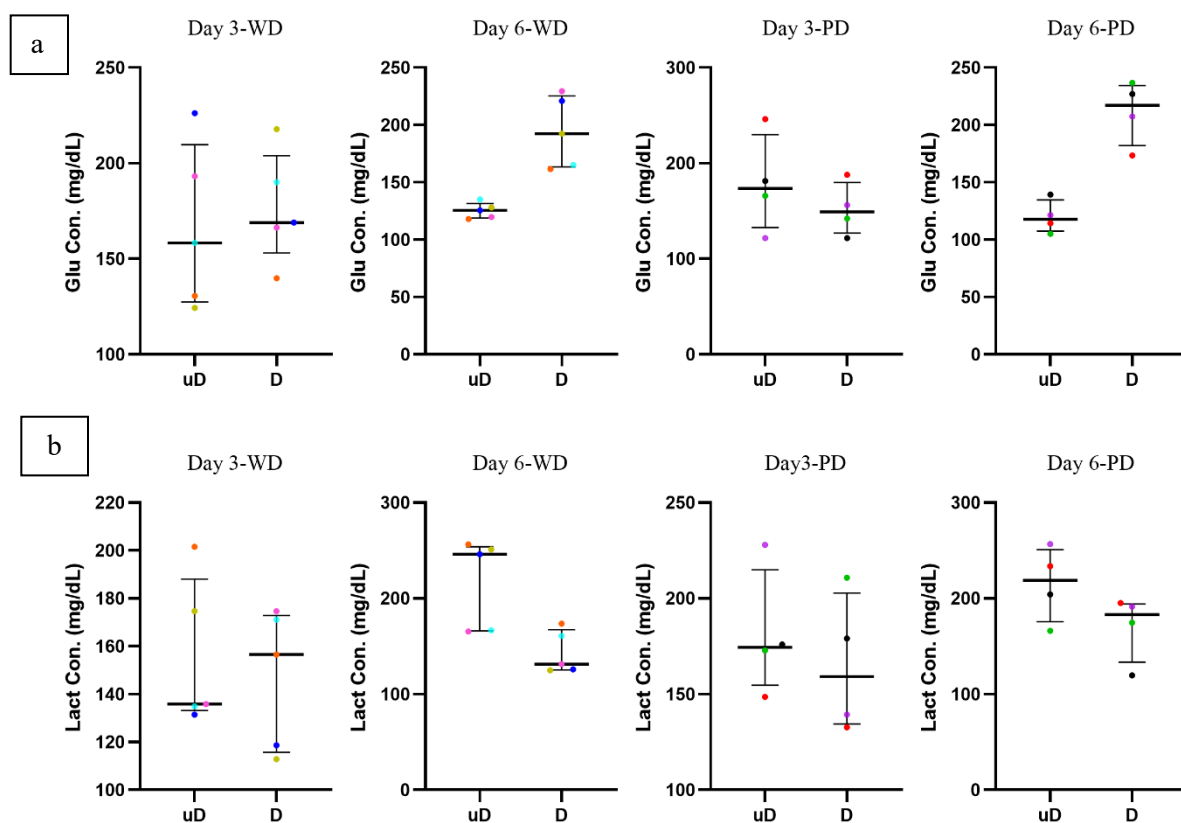
(a) غلظت گلوکز در روز ۳ (b) غلظت گلوکز در روز ۶ (c) غلظت لاکتات در روز ۳ (d) غلظت لاکتات در روز ۶ (e) غلظت پیرووات در روز ۶ پس از تمایز. D نماینده گروه تمایز یافته و uD نماینده گروه تمایز نیافته.

گلوکز روز ۶ با $p\text{ val} = 0.0039$ و لاکتات روز ۶ با $p\text{ val} = 0.0117$ معنی دار می باشد.

همانطور که از نتایج برمی آید اگرچه در روز ۳ پس از القای دسی جوآلیزیشن تفاوت معنی داری به لحاظ غلظت گلوکز و لاکتات میان دو گروه سلول های تمایز نیافته و تمایز یافته وجود ندارد اما در روز ۶ به نظر می رسد سلول های تمایز نیافته گلوکز بیشتری مصرف می کنند و لاکتات بیشتری تولید می کنند.

۱-۵-۳- مقایسه غلظت گلوکز و لاکتات در سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶ پس از تمایز دسی جوآلیزیشن

تصاویر زیر نتایج مقایسه غلظت این دو ماده بیوشیمیایی مرتبط با گلیکولیز را نشان می دهد که در برخی حالت ها امکان معنی داری وجود دارد اما به دلیل حجم نمونه کم در هر گروه WD یا PD این تغییرات به لحاظ آماری معنی دار نمی باشد.



شکل ۱۰. مقایسه اثر دسی جوآلیزیشن در سورس های سلولی WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر بر غلظت گلوکز و لاکتات در روز ۳ و ۶ پس از تمایز

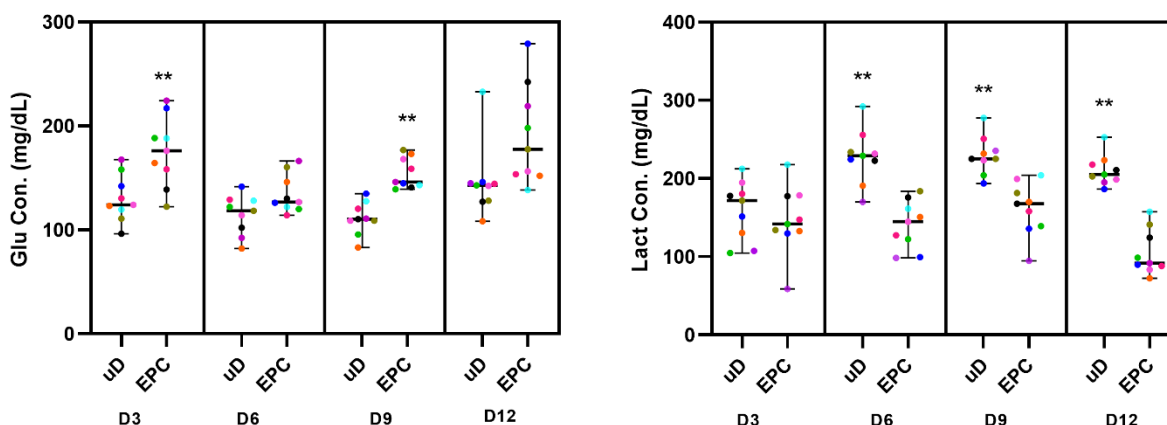
(a) غلظت گلوکز در روز ۳ و ۶ پس از تمایز در سورس های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر

(b) غلظت لاکتات در روز ۳ و ۶ پس از تمایز در سورس های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر

منظور از D گروه تمایز یافته و uD گروه تمایز نیافته است.

*ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر غلظت گلوکز و لاکتات در سلول های بنیادی خون قاعدگی در دست بررسی است و در گزارش نهایی طرح ارائه می شود.

۳-۶- ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش EPC بر غلظت گلوکز و لاکتات در سلول های مزانشیمی اندومتر جهت مقایسه اثر روش تمایزی بر روند تغییرات گلوکز و لاکتات، غلظت این دو متابولیت در سلول های مزانشیمی اندومتر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از القای دسی جوالیزیشن به روش EPC مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱۱. اثر دسی جوالیزیشن به روش EPC بر غلظت گلوکز و لاکتات در روز ۳ تا ۱۲ پس از تمایز در سلول های مزانشیمی اندومتر

مقادیر p value برای گروههای مختلف: گلوکز روز ۳ و ۹ و لاکتات روزهای ۶، ۹، و ۱۲: $p\text{ val} = 0.0039$

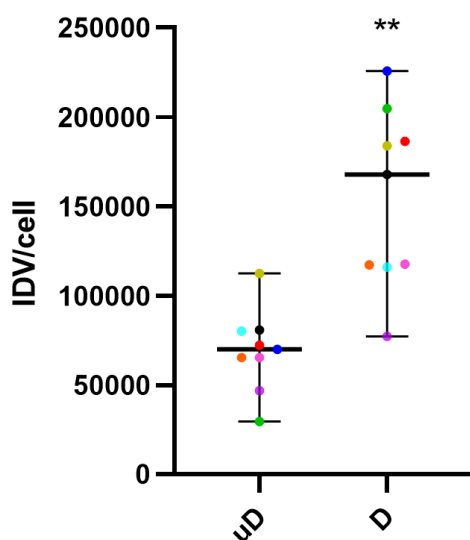
نتایج نشان می دهد که در روش تمایزی EPC نیز سلول های تمایز یافته گلوکز کمتری به نسبت سلول های تمایز نیافته مصرف می کنند و بالتبع سطح لاکتات آن ها از سلول های تمایز نیافته پایینتر است.

*ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش EPC بر غلظت گلوکز و لاکتات در سلول های بنیادی خون قاعدگی در دست بررسی است و در گزارش نهایی طرح ارائه می شود.

۳-۷- ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) در سلول های مزانشیمی اندومتر

همانگونه که در بیان مسئله این طرح پژوهشی ذکر گردید دسی جوالیزیشن با حضور جمعیتی از سلول های پیر (senescent) با ویژگی ترشح فاکتورهای التهابی آغاز می شود که در روند دسی جوالیزیشن افزایش می یابند. در شرایط داخل بدن (*In vivo*) سلول های کشنده طبیعی (NK) این سلول ها را حذف می کنند تا از پیر شدن سایر سلول ها و افزایش پیری (senescence) در جمعیت

سلول های استرومای اندومتر جلوگیری کنند. ولی در شرایط آزمایشگاهی بدلیل عدم حضور جزء سوم یعنی سلول های NK با گذشت زمان از القای دسی جوالیزیشن، تعداد سلول های پیر افزایش می یابد که از مارکرهای قابل ارزیابی آن درصد سلول هایی است که به لحاظ فعالیت بتا گالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) مثبت هستند. فعالیت این آنزیم لیزوزومی در PH=6 یکی از روش های رایج ارزیابی سلول های پیر است. از آن جا که سلول های پیر دچار افزایش اندازه نیز خواهند شد براساس مقالات معتبر اخیر، درصد سلول های رنگ گرفته با نرم افزار ImageJ به روش رنگ سنجی (پس از افزودن سوبسترای این آنزیم یعنی X-Gal) با شاخصی به نام Integrated density value (IDV) ارزیابی خواهد شد که اندازه سلول ها را نیز در دو گروه نرمال سازی کند. علاوه بر آن هسته سلول ها با رنگ آمیزی DAPI نیز رنگ آمیزی می شود تا IDV برحسب تعداد سلول نرمالایز شود.



شکل ۱۲. اثر دسی جوالیزیشن بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر همانگونه که

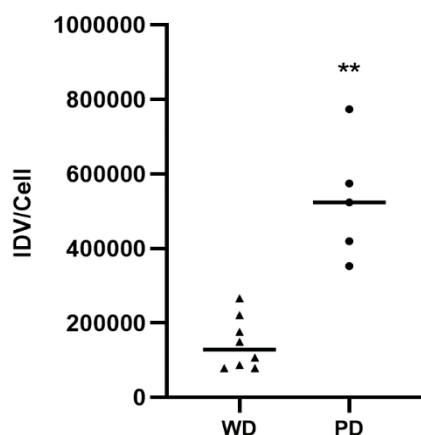
یافته ها نشان می

دهد سطح معنی داری افزایش شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز در گروه تمایز یافته (D) نسبت به گروه تمایز نیافته (uD) با $p = 0.0039$ گزارش شده است. محور y نشان دهنده IDV (Integrated density value) برحسب هر سلول است که با نرم افزار J: senescence (براساس محاسبه شده است).

در (IDV/Cell

سلول های مزانشیمی اندومتر پس از القای دسی جوالیزیشن به روش PC افزایش خواهد یافت.

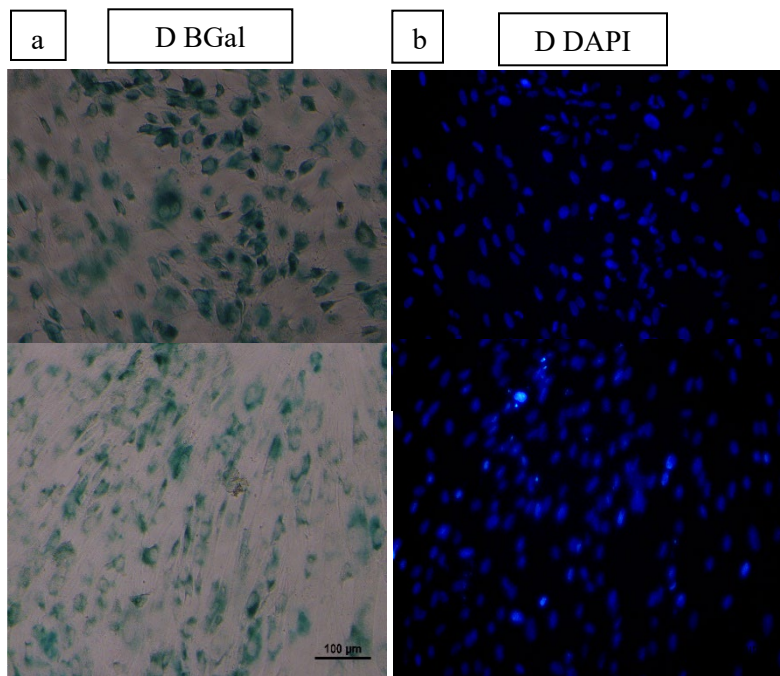
۸-۳- مقایسه سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) میان سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر



شکل ۱۳. مقایسه اثر دسی جوالیزیشن بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD مزانشیمی اندومتر

سطح این شاخص در گروه PD نسبت به WD به صورت معنی داری بالاتر است ($p\text{ val} = 0.0039$). محور تصاویر مربوط به رنگ دهنده (Integrated density value) IDV برحسب هر سلول است که با نرم افزار ImageJ محاسبه شده است. آمیزی فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) در سلول های مزانشیمی اندومتر پس از القای دسی جوالیزیشن در مقایسه با سلول های تمایز نیافته در ادامه قابل مشاهده است.

تصاویر مربوط به رنگ آمیزی senescence در سلول های مزانشیمی اندومتر قبل و بعد از القای دسی جوالیزیشن

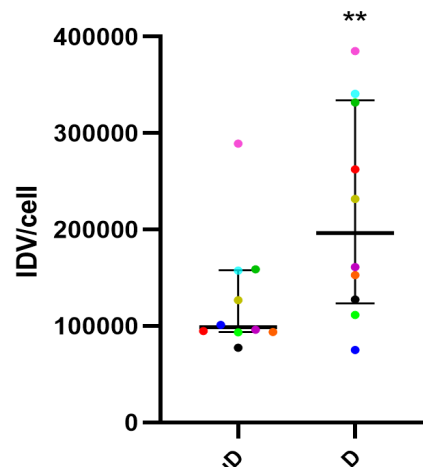


شکل ۱۴. تصاویر مربوط به رنگ آمیزی senescence در سلول های مزانشیمی اندومتر قبل و بعد از تمایز دسی جوالیزیشن

(a) تصاویر مربوط به بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (BGal)
(b) تصاویر مربوط به رنگ آمیزی هسته (DAPI)
D گروه تمایز یافته و uD گروه تمایز نیافته را نشان می دهد.

ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش EPC بر سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) در سلول های مزانشیمی اندومتر انجام شد و نتایج آن در گزارش نهایی طرح ارائه می شود.

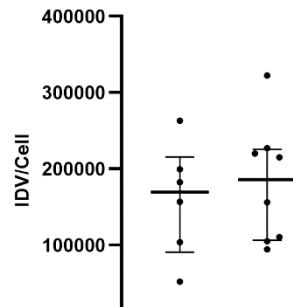
۳-۹- ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن به روش PC بر سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) در سلول های بنیادی خون قاعدگی



شکل ۱۵. اثر دسی جوالیزیشن بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های بنیادی خون قاعدگی همانگونه که در نمودار مشخص است در سلول های بنیادی خون قاعدگی نیز میزان پیری پس از القای دسی جوالیزیشن به روش PC افزایش می یابد. جالب توجه است که با مقایسه نمودار این سلول ها و نمودار مشابه مربوط به سلول های مزانشیمی اندومتر میتوان دریافت که سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های بنیادی خون قاعدگی بصورت پایه بالاتر از سلول های مزانشیمی اندومتر است که این امر با ویژگی این سلول ها تطابق دارد.

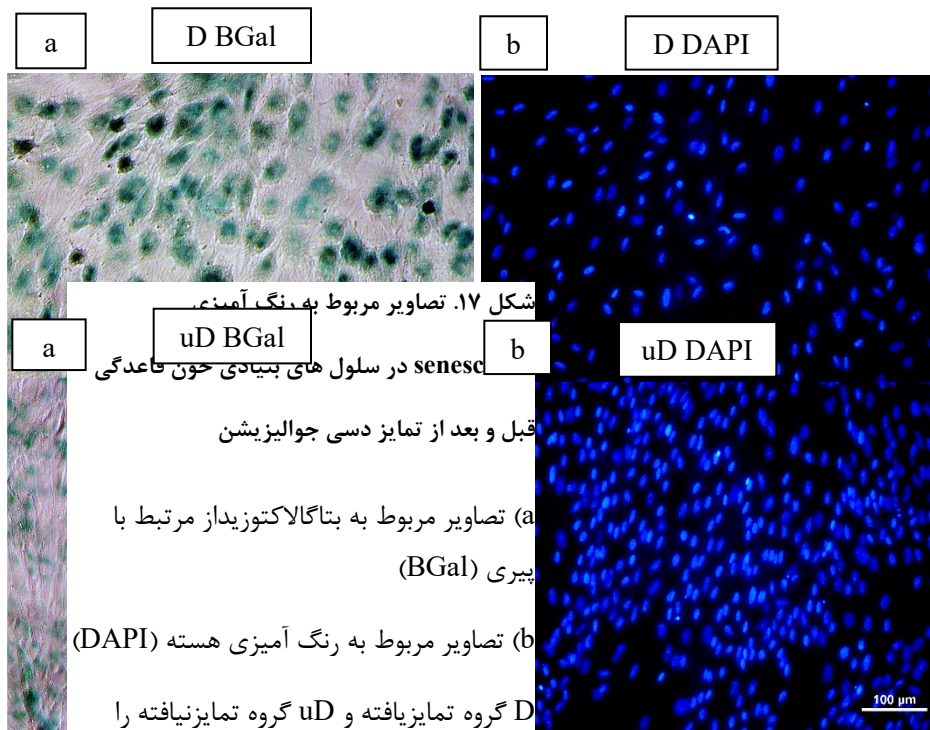
همان گونه که از نمودارها قابل استناد است سطح پایه پیری در سلول های تمایز نیافته خون قاعدگی بالاتر از سلول های تمایز نیافته مزانشیمی اندومتر است ولیکن در هردو نوع سوری سلولی طی دسی جوالیزیشن، میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری افزایش می یابد.

۳-۱۰- مقایسه سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) میان سلول های WD و PD بنیادی خون قاعدگی



نمودار بالا نشان می‌دهد که در سلول‌های بنیادی خون سطح این شاخص در گروه PD نسبت به WD به صورت معنی‌داری بالاتر است ($p\text{ val} = 0.0039$). محور y نشان‌دهنده قاعدگی (Integrated density value) برحسب هر سلول است که با نرم افزار ImageJ محاسبه شده است. همانند سلول

های مزانشیمی اندومتر سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سوره‌س‌های PD بالاتر از WD است ولیکن این تغییرات به لحاظ آماری معنی‌دار نیست.



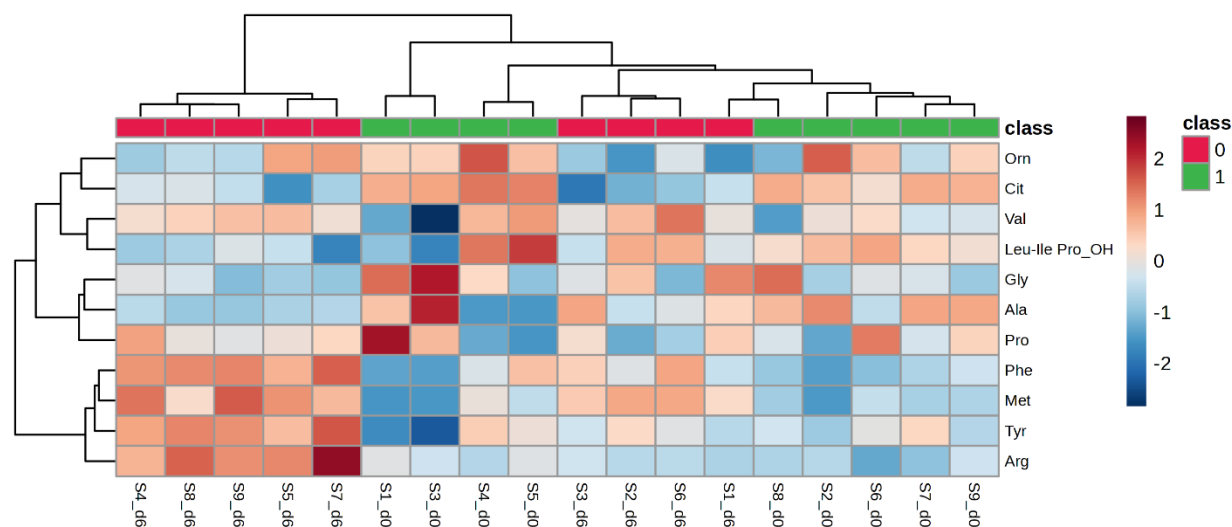
شکل ۱۷. تصاویر مربوط به رنگ آمیزی senesc در سلول‌های بنیادی خون قاعدگی

قبل و بعد از تمایز دسی جوانی‌زیشن (a) تصاویر مربوط به بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (BGal) (b) تصاویر مربوط به رنگ آمیزی هسته (DAPI) D گروه تمایز یافته و uD گروه تمایز نیافته را نشان می‌دهد.

از آن‌جا که سلول‌های پیر با ترشح فاکتورهای التهابی مرتبط با پیری (SASP) از جمله سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 مشخص می‌شوند اثر دسی جوانی‌زیشن به دو روش PC و EPC بر غلظت این سایتوکاین‌ها در سلول‌های مزانشیمی اندومتر و سلول‌های بنیادی خون قاعدگی ارزیابی شد که در دست اقدام است و نتایج آن در گزارش نهایی ارائه خواهد شد.

۱۱-۳- ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن بر متابولوم سلول های مزانشیمی اندومتر

به منظور بررسی اثر دسی جوالیزیشن بر متابولوم در سلول های مزانشیمی اندومتر، سوپ رویی حاصل از کشت سلول های دسی جوالیزه (تمایز یافته) و سلول های تمایز نیافته در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن به روش اسپکترومتری جرمی ارزیابی و غلظت متابولیت ها سنجیده شد. نمودار heatmap زیر نشان می دهد در روز ۳ پس از القا، تفاوت میان سلول هایی که قدرت دسی جوالیزیشن بالایی دارند (well-decidualized) از سلول هایی که از قدرت دسی جوالیزیشن مناسبی برخوردار نیستند (poor-decidualized) (براساس شاخص غلظت پرولاکتین در آزمایش های قبل) کاملاً مشخص می شود و علاوه بر آن جالب توجه است که سلول های poor-decidualized در کنار سلول های تمایز نیافته طبقه بندی شده اند که این موضوع به صحت طبقه بندی میان سلول ها به لحاظ قدرت دسی جوالیزیشن اعتبار می بخشد

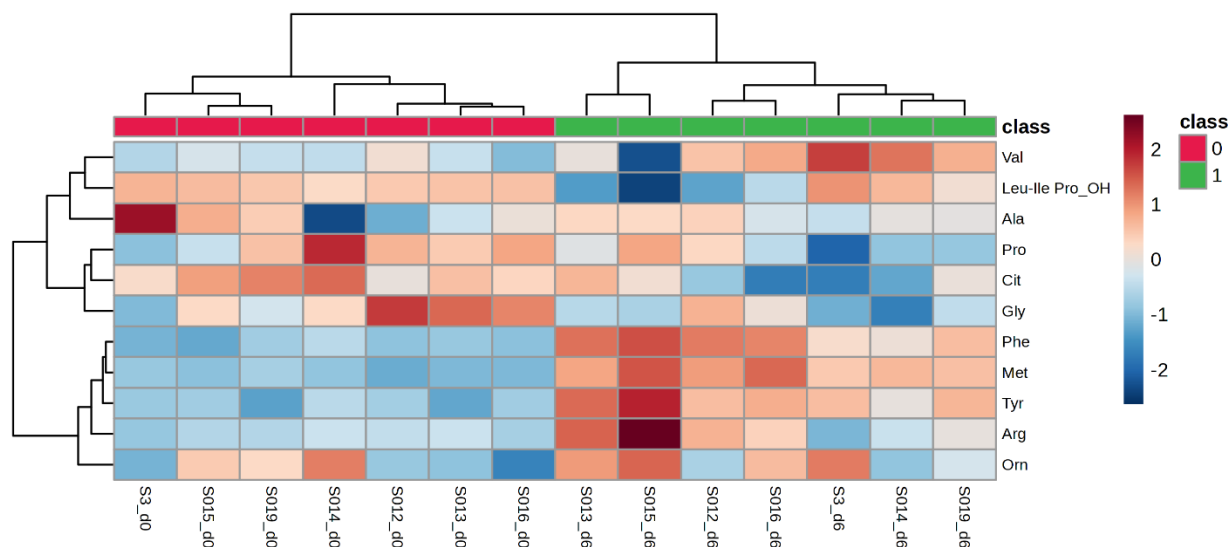


شکل ۱۸. نمایش تفاوت متابولیت ها در heatmap در دو گروه سلول های تمایز یافته D (کلاس ۰) و تمایز نیافته uD (کلاس ۱) در

روز ۳ پس از تمایز دسی جوالیزیشن

نمودار دندروگرام در بالا نشانه طبقه بندی سلول ها براساس شباهت در تغییرات غلظت متابولیت ها و راهنمای رنگی نشانه افزایش بیان (قرمز) و یا کاهش بیان (آبی) می باشد.

اما همانطور که در نمودار زیر مشخص است در روز ۶ پس از القا، سلول های تمایز یافته صرف نظر از توان دسی جوالیزیشن در کنار هم و سلول های تمایز نیافته نیز در کنار هم خوشه بندی شده اند. پس به نظر می رسد در خصوص سلول های مزانشیمی اندومتر، روز ۳ و میانه فرآیند دسی جوالیزیشن جهت تفکیک و بهره مندی از توان دسی جوالیزیشن مناسبتر باشد.



شکل ۱۹. نمایش تفاوت متابولیت ها در heatmap در دو گروه سلول های تمایز یافته D (کلاس ۰) و تمایز نیافته uD (کلاس ۱) در

روز ۶ پس از تمایز دسی جوالیزیشن

نمودار دندروگرام در بالا نشانه طبقه بندی سلول ها براساس شباهت در تغییرات غلظت متابولیت ها و راهنمای رنگی نشانه افزایش بیان (قرمز) و یا کاهش بیان (آبی) می باشد.

*ارزیابی اثر دسی جوالیزیشن بر متابولوم سلول های بنیادی خون قاعدگی در دست بررسی است و در گزارش نهایی طرح ارائه می شود.

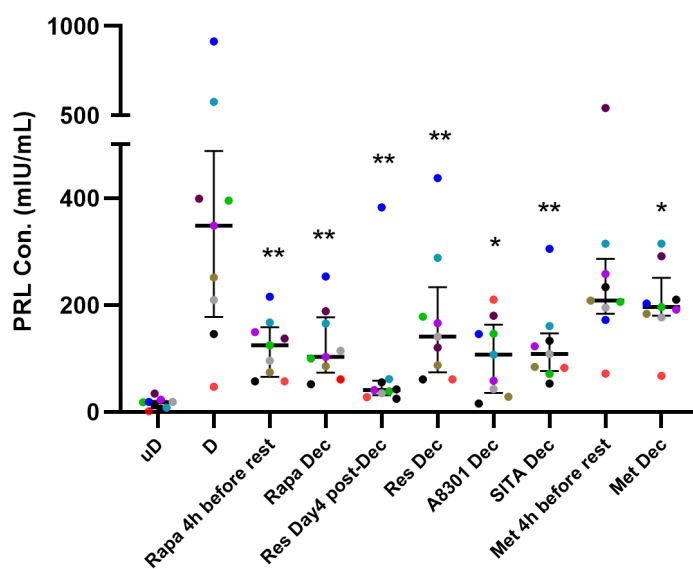
۱۲-۳- ارزیابی اثر ترکیبات تعدیل کننده پیری (senomorphic) بر دسی جوالیزیشن سلول های مزانشیمی اندومتر

براساس مقالات، عوامل senomorphic قادرند با تنظیم مسیرهای انتقال پیام و یا مهار بیان فرآورده های مرتبط با سلول های پیر (SASP) عملکرد این سلول ها را کنترل کنند. علی رغم مواد senolytic که باعث القای آپوپتوز در سلول های senescent یا پیر می شوند، مواد senomorphic نقشی در کشتن این سلول ها ندارند. بدیلی که در بیان مسئله گفته شد، از آن جا که سلول های senescent در شروع و در جریان دسی جوالیزیشن نقش بسزایی دارند و حضور مداوم آن ها علاوه بر وجود مزایا سبب القای پیری در سایر سلول ها و اختلال خواهد شد، در این بخش بر اثر ترکیبات senomorphic بر دسی جوالیزیشن سلول های مزانشیمی اندومتر پرداختیم.

براساس مقالات ترکیبات senomorphic ای که مورد استفاده قرار گرفت شامل راپامایسین، رزوراترول، مهارکننده $TGF-\beta$ (A8301)، متفورمین، سیتاگلیپتین و پردنیزولون بود. در ابتدا درمورد هر ماده، زمان تیمار و پرتکرارترین غلظتی که در مطالعات مختلف استفاده شده بود انتخاب شد. براساس مقالات، قرار شد سلول ها با راپامایسین با غلظت ۱۰۰ نانومولار ۴ ساعت قبل از rest

هورمونی، رزوراترول با غلظت ۱۲.۵ میکرومولار در دو زمان روز القا و روز ۴ تمایز، A8301 با غلظت ۱ میکرومولار در زمان القا، سیتاگلیپتین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در زمان القا، متفورمین با غلظت ۱ میلی مولار در زمان القا به همراه کنترل مثبت PC و کنترل منفی سلول های تمایزنیافته تیمار شوند. طبق مقاله اخیری که درخصوص اثر رزوراترول بر دسی جوالیزیشن انجام شده بود زمان تیمار سلول ها یعنی تجویز رزوراترول در زمان القای دسی جوالیزیشن و یا در روند تمایز و غلظت این ترکیب می تواند بر روی دسی جوالیزیشن اثرات متفاوتی داشته باشد.

در ابتدا اثر زمان تیمار سلول های مزانشیمی اندومتر با عوامل senomorphic مورد بررسی قرار گرفت. سلول ها با راپامایسین با غلظت ۱۰۰ نانومولار و متفورمین با غلظت ۱ میلی مولار در دو زمان ۴ ساعت پیش از rest هورمونی و زمان القای دسی جوالیزیشن، رزوراترول با غلظت ۱۲.۵ میکرومولار در روز ۱ و ۴ القای دسی جوالیزیشن، A8301 با غلظت ۱ میکرومولار و سیتاگلیپتین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در زمان القای دسی جوالیزیشن تیمار شدند.



اندومتر

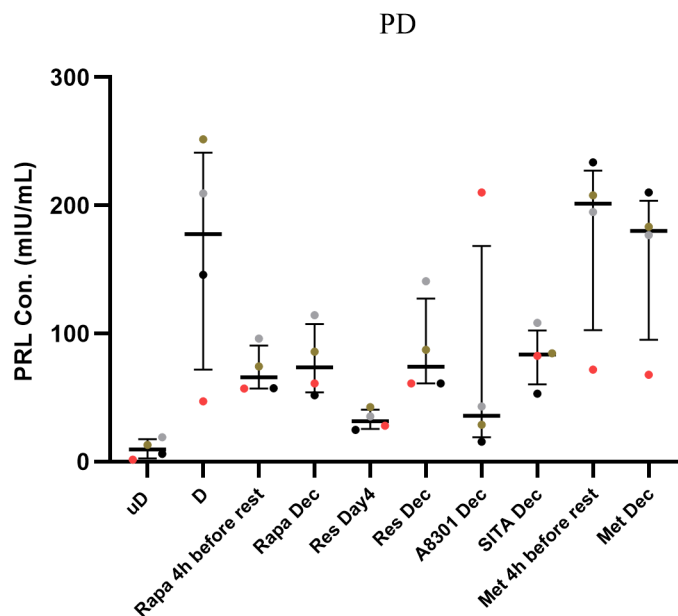
تغییر غلظت راپامایسین در زمان تیمار ۴ ساعت پیش از rest هورمونی با $p\text{ val} = 0.0078$ ، راپامایسین در زمان القای تمایز دسی جوالیزیشن با $p\text{ val} = 0.0078$ ، رزوراترول در زمان تیمار ۴ روز پس از دسی جوالیزیشن با $p\text{ val} = 0.0039$ ، رزوراترول در زمان القای تمایز دسی جوالیزیشن با $p\text{ val} = 0.0078$ ، A8301 در زمان القای تمایز دسی جوالیزیشن با $p\text{ val} = 0.0117$ ، سیتاگلیپتین در زمان القای تمایز دسی جوالیزیشن با $p\text{ val} = 0.0078$ و متفورمین در زمان القای تمایز دسی جوالیزیشن با $p\text{ val} = 0.0273$ معنی دار می باشد.

uD: تمایز نیافته؛ D: تمایز یافته؛ Rapa: راپامایسین؛ Res: رزوراترول؛ SITA: سیتاگلیپتین؛ Met: متفورمین

Dec پس از نام دارو نشانه زمان تیمار دارو همزمان با القای دسی جوالیزیشن است

بر اساس نمودار فوق، مقایسه میانه ها نشان می دهد که تیمار سلول های مزانشیمی اندومتر با کلیه عوامل senomorphic در غلظت و زمان های مربوطه می تواند دسی جوالیزیشن را کاهش دهد. این اثر در مورد همه سورس های سلولی مورد آزمایش در سلول های مزانشیمی اندومتر مشاهده می شود.

در صورتی که نمودار را برحسب پتانسیل دسی جوالیزیشن در سلول های مزانشیمی اندومتر تفکیک کنیم اثر عوامل senomorphics بر دسی جوالیزیشن سلول های PD یا با تمایز ضعیف به شکل زیر در می آید:

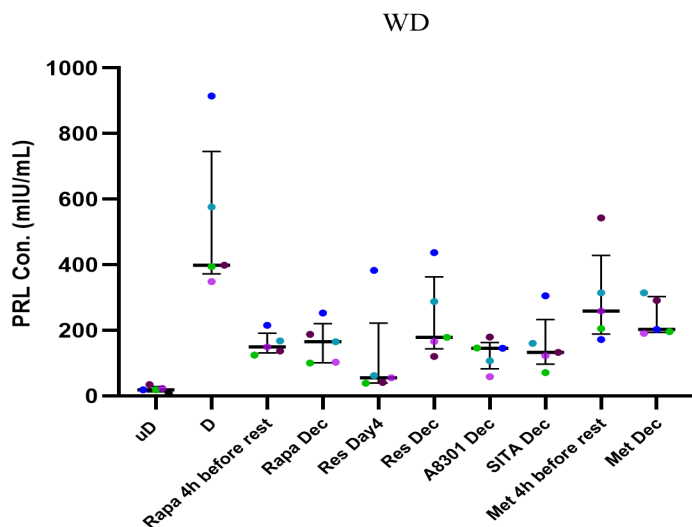


شکل ۲۱. آزمایش اولیه بر روی اثر زمان تیمار عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در سوره های PD سلول های مزانشیمی اندومتر

uD: تمایز نیافته; D: تمایز یافته; Rapa: راپامایسین; Res: رزوراترول; SITA: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین

Dec پس از نام دارو نشانه زمان تیمار دارو همزمان با القای دسی جوالیزیشن است

همانطور که در نمودار فوق مشخص است، متفورمین بر روی سلول های با تمایز ضعیف یا PD اثر افزایشی در تولید پرولاکتین دارد که به احتمال زیاد به علت کم بودن تعداد سوره های PD (حجم نمونه در این گروه) این اثر به لحاظ آماری معنی دار نبوده است. در مورد سلول های با تمایز قوی، عوامل senomorphic سبب مهار دسی جوالیزیشن می شوند که این اختلاف نیز معنی دار نبود. اگرچه p value ها نزدیک به ۰.۰۵ بود و به احتمال زیاد حجم نمونه کم در گروه WD علت عدم معنی داری می باشد.



شکل ۲۲. آزمایش اولیه بر روی اثر زمان تیمار

عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در

سوره های WD سلول های مزانشیمی اندومتر

uD: تمایز نیافته; D: تمایز یافته; Rapa: راپامایسین;

Res: رزوراترول; SITA: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین

Dec پس از نام دارو نشانه زمان تیمار دارو همزمان با

القای دسی جوالیزیشن است

800000
**

شکل ۲۳. آزمایش اولیه بر روی اثر زمان تیمار عوامل

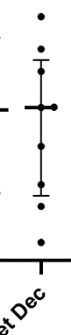
senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری

در سلول های مزانشیمی اندومتر

درمقایسه آماری D (گروه تمایزیافته) نسبت به uD (گروه

تمایزیافته) و نیز مقایسه روزراترول در روز ۴ پس از تمایز

نسبت به گروه D $p\text{ val} = 0.0039$ می باشد.



همان گونه که از نمودار بالا مشخص است، درمقایسه میانگین هر تیمار با گروه کنترل PC بدون ماده، تیمار سلول های مزانشیمی اندومتر با عوامل senomorphic تغییر معنی داری در سطح senescence ایجاد نمی کند. در مورد برخی مواد کاهش دیده می شود که این تغییرات معنی دار نبود.

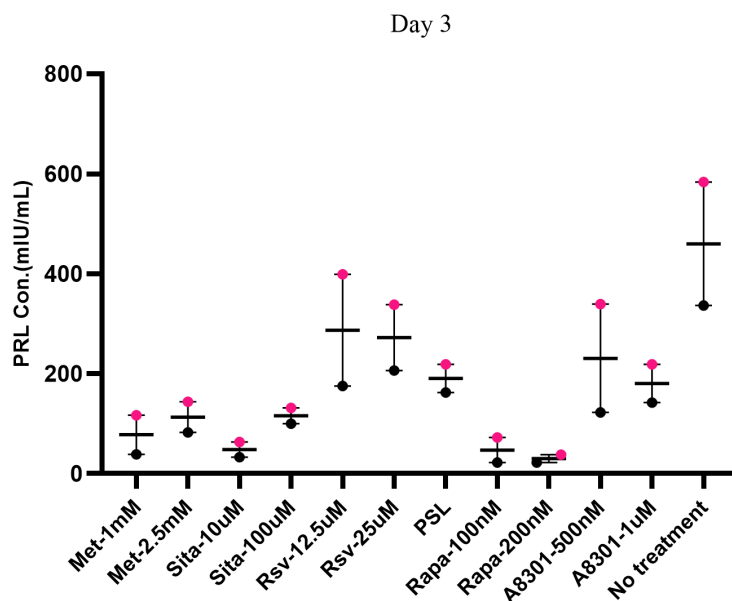
uD: تمایزیافته; D: تمایزیافته; Rapa: راپاماسین; Res: روزراترول;

SITA: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین

Dec پس از نام دارو نشانه زمان تیمار دارو همزمان با القای دسی

جوالیزیشن است

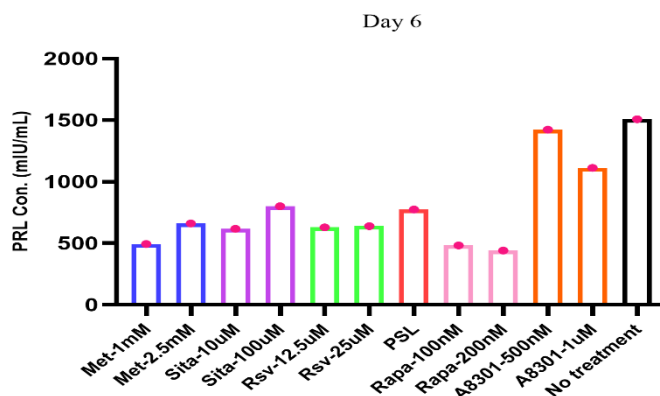
جوالیزیشن با این عوامل مواجه شوند. سؤال این بود که چندروز پیش از القای دسی جوالیزیشن زمان مناسبی برای تیمار سلول ها با این عوامل می باشد. بنابراین دو سورت سلولی اندومتر با کلیه عوامل senomorphic هر یک با دو غلظت در دو زمان ۳ و ۵ روز پیش از القای دسی جوالیزیشن تیمار شدند. در روز ۳ هر دو سورت سالم بودند لیکن در روز ۶ یکی از سورت ها از بین رفت. نمودارها به صورت زیر قابل ارائه است.



شکل ۲۴. آزمایش اولیه درخصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic بر روی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی

اندومتر روز ۳ پس از القای تمایز پروتکل ۲ روز تیمار پیش از شروع تمایز

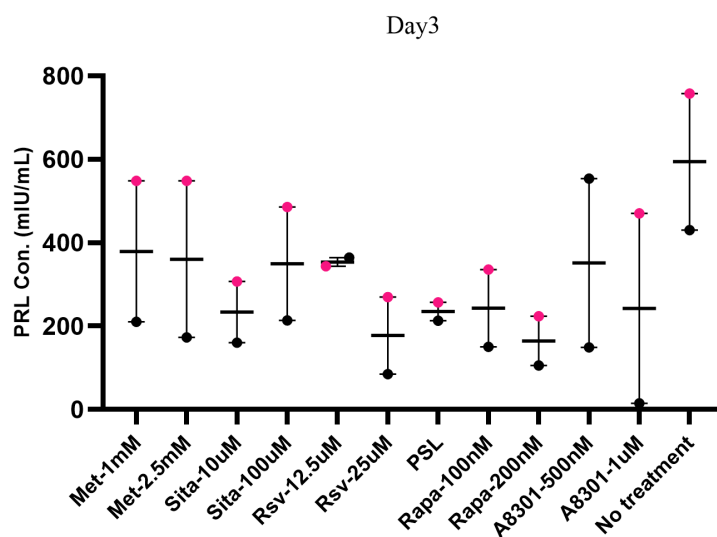
Rapa: راپامایسین; PSL: پردنیزولون; Rsv: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین



شکل ۲۵. آزمایش اولیه درخصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic برروی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی

اندومتر روز ۶ پس از القای تمایز پروتکل ۲ روز تیمار پیش از شروع تمایز

Rapa: راپامایسین; PSL: پردنیزولون; Rsv: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین



شکل ۲۶. آزمایش اولیه درخصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic

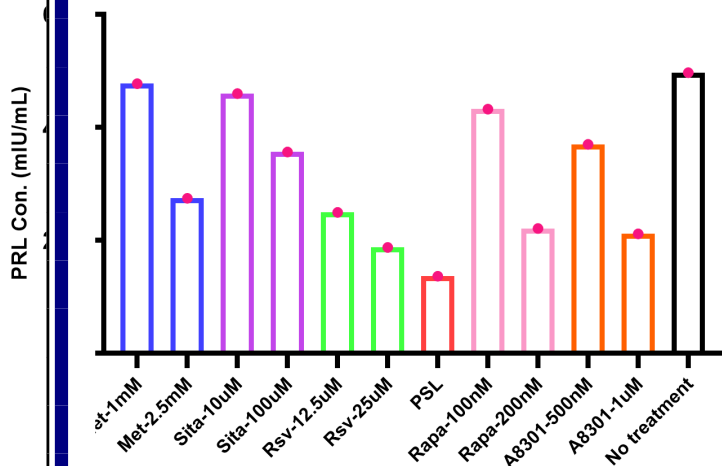
برروی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر روز ۳ پس از القای

تمایز پروتکل ۵ روز تیمار پیش از شروع تمایز

Rapa: راپامایسین; PSL: پردنیزولون; Rsv: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین

متفورمین

Day 6



شکل ۲۷. آزمایش اولیه در خصوص بررسی اثر غلظت عوامل senomorphic بر روی غلظت پرولاکتین در سلول های مزانشیمی اندومتر روز ۳ پس تمایز پروتکل ۵ روز تیمار پیش از شروع تمایز

Rapa: راپامایسین; PSL: پردنیزولون; Rsv: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپت متفورمین

در مورد A8301 هردو غلظت، و در مورد سایر عوامل senomorphic غلظت پایین تر و زمان تیمار ۵ روز پیش از القای دسی جوالیزیشن جهت انجام تست های اصلی انتخاب شد.

غلظت های مورد استفاده در این آزمایش اول: (مواردی که زیر آن ها خط کشیده شد در تست های بعدی مورد استفاده قرار گرفت)

پردنیزولون: ۰.۵ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر

سیتاگلیپتین: ۱۰ میکرومولار، ۱۰۰ میکرومولار

متفورمین: ۱ میلی مولار و ۲.۵ میلی مولار

A8301: ۵۰۰ نانومولار و ۱ میکرومولار

رزوراترول: ۱۲.۵ میکرومولار و ۲۵ میکرومولار

راپامایسین: ۱۰۰ نانومولار و ۲۰۰ نانومولار

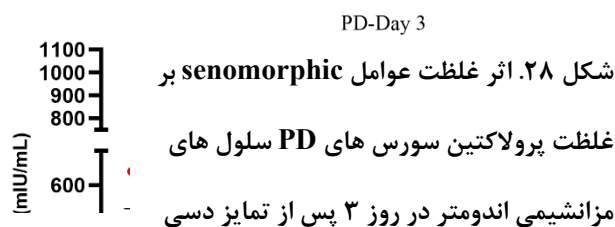
اثر عوامل senomorphic بر روی سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی با دو پروتکل زمانی treatment یعنی تیمار سلول ها همزمان با روز القای دسی جوالیزیشن و pretreatment یعنی تیمار سلول ها ۷ روز قبل از القای دسی جوالیزیشن با عوامل senomorphic (۵ روز تیمار با مواد و ۲ روز رست هورمونی) و انتخاب دو غلظت ذکر شده در بالا (۵۰۰ نانومولار و ۱ میکرومولار) برای ماده A8301 و غلظت پایین برای سایر مواد مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر دو پروتکل، غلظت پرولاکتین پس از تیمار سلول ها با این عوامل در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن در مقایسه با گروه کنترل PC مورد سنجش قرار گرفت و در روز ۶ شدت پیری با استفاده از تست رنگ سنجی بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری (SABG) ارزیابی شد.



درخصوص سلول های مزانشیمی اندومتر به عنوان سلول های استاندارد که در رحم قدرت دسی جوایزیشن دارند، به کارگیری پروتکل treatment در آزمایش های تکرارپذیر سبب مرگ سلول ها و ناتوانی در سنجش پرولاکتین شد. لذا نتایج حاصل از پروتکل pretreatment مدنظر قرار گرفت.

برای اطمینان از غلظت های انتخابی و اثر داروها، پروتکل pretreatment بر روی ۴ سوره PD از سلول های مزانشیمی اندومتر انجام شد.

نمودارهای مربوط به غلظت پرولاکتین در روز ۳ و ۶ پس از دسی جوایزیشن در پروتکل pretreatment در سلول های PD اندومتر به صورت زیر قابل مشاهده است:

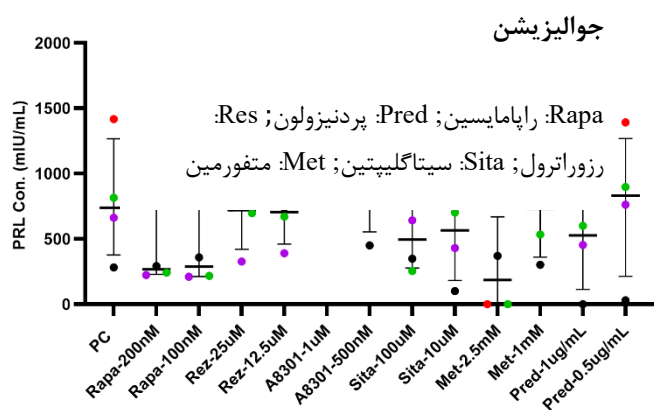


شکل ۲۹. اثر غلظت عوامل senomorphic بر

غلظت پرولاکتین سوره های PD سلول های

مزانشیمی اندومتر در روز ۶ پس از تمایز دسی

جوایزیشن



Rapa: راپامایسین; Pred: پردنیزولون; Res: رزوراترول;

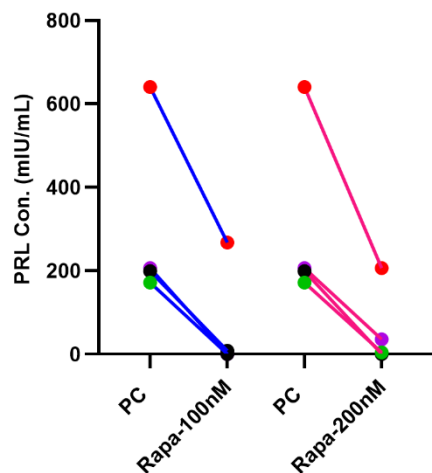
Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین



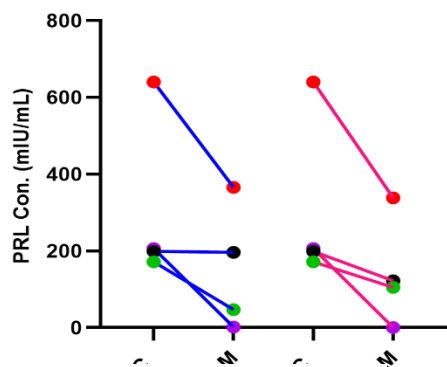
a

بصورت دقیق تر مقایسه غلظت ها در مورد عوامل senomorphic در قالب نمودارهای خطی زیر قابل استنتاج است.

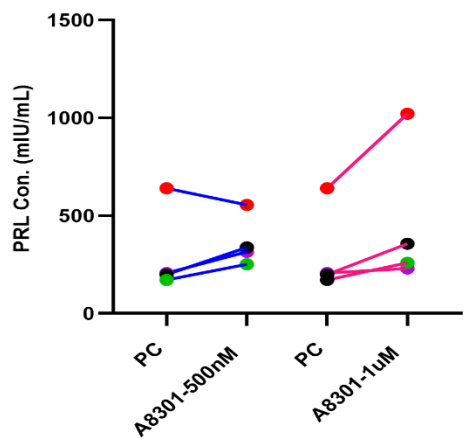
Day 3



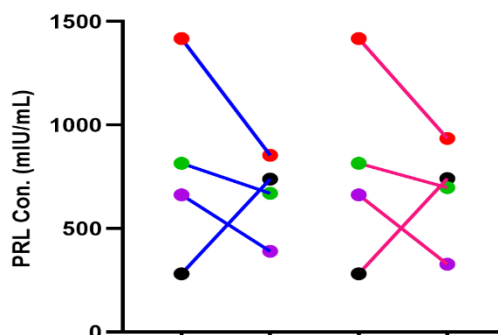
Day 3



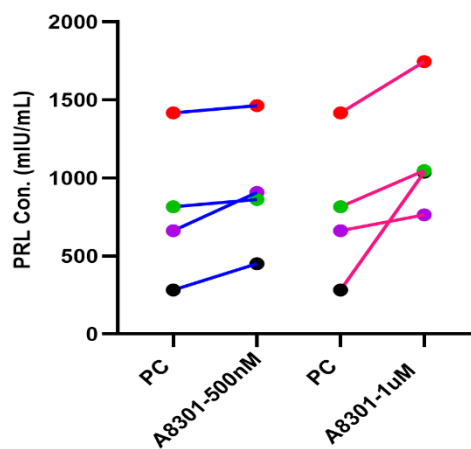
Day 3

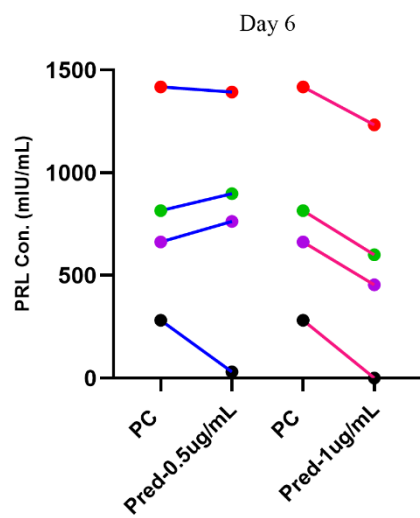
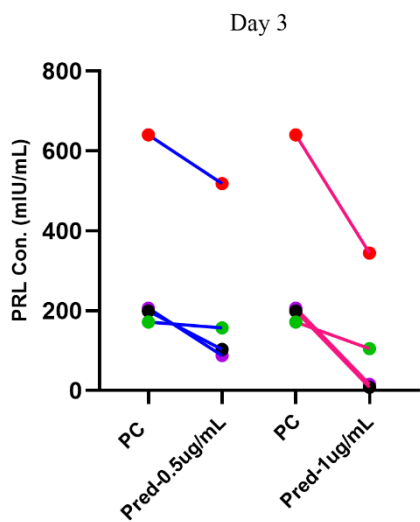
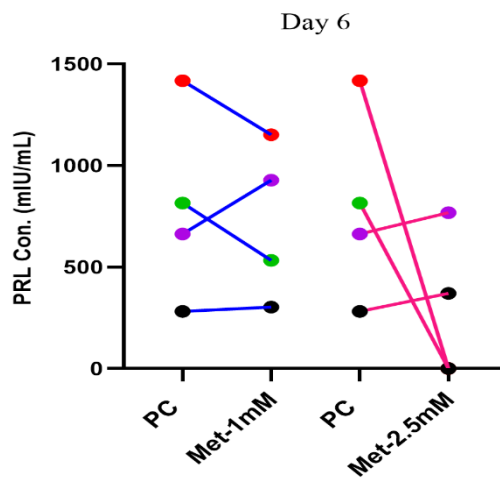
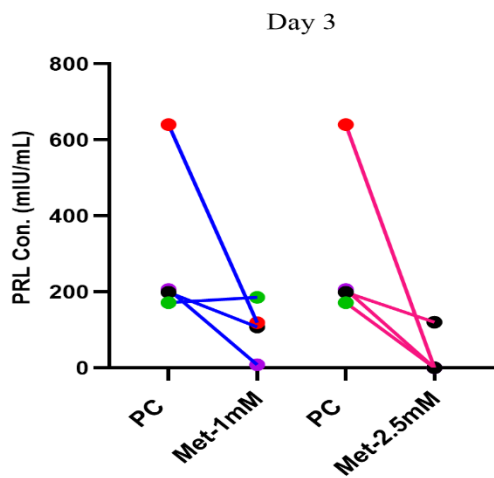
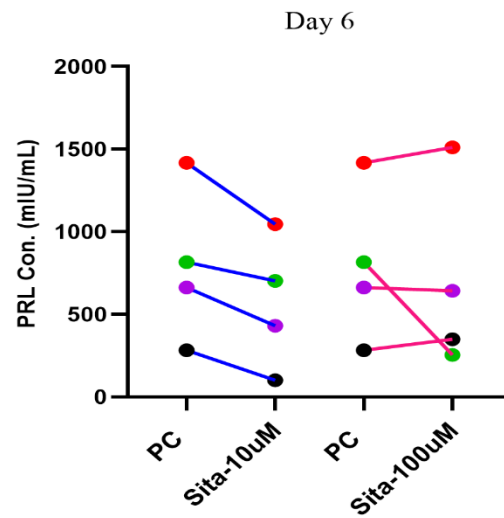
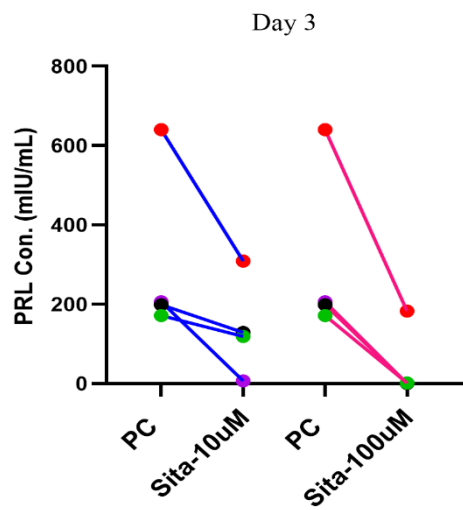


Day 6



Day 6







شکل ۳۰. مقایسه غلظت پایین و بالای هر عامل senomorphic بر غلظت

پرولاکتین سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن

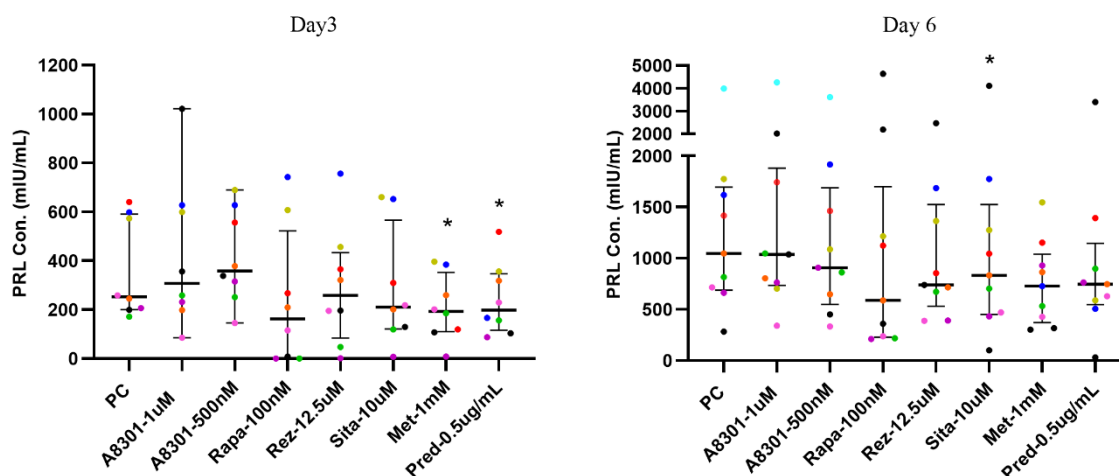
Rapa (a): راپامایسین; Rez (b): رزوراترول; A8301(c); Sita(d): سیناگلیپتین

Met (e): متفورمین; Pred (f): پردنیزولون

در مورد بسیاری از عوامل senomorphic در مقایسه تیمار سلول ها با غلظت بالای آن ماده نسبت به تیمار سلول ها با غلظت پایین الگوی تغییر سطح پرولاکتین نسبت به گروه کنترل PC الگوی یکسانی بود و لذا غلظت پایینتر انتخاب شد. متفورمین در غلظت بالا (۱ میلی مولار) و پردنیزولون در غلظت بالا (۱ میکروگرم بر میلی لیتر) باعث بدحالی سلول ها می شد و لذا در مورد این ماده نیز غلظت پایینتر (۰.۵ میکروگرم بر میلی لیتر) انتخاب شد. در مورد A8301 از آن جا که هر دو غلظت پایین (۵۰۰ نانومولار) و بالای (۱ میکرومولار) این ماده در هر دو روز ۳ و ۶ اثر افزایشی بر تولید پرولاکتین داشتند هر دو غلظت در آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۱۳-۳- ارزیابی اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در کلیه سلول های مزانشیمی اندومتر

در مرحله بعد، پروتکل pretreatment که در این آزمایش صرفاً بر روی ۴ سورس PD سلول های مزانشیمی اندومتر انجام شده بود بر روی ۵ سورس WD دیگر نیز انجام شد و اجماع نتایج غلظت پرولاکتین در مورد کلیه سورس ها در روز ۳ و ۶ به صورت زیر نمایش داده می شود (دراثر اجماع نتایج فقط بر روی غلظت های انتخابی ارائه می شود):



شکل ۳۱. اثر غلظت های انتخابی از عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین کلیه سورس های سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن

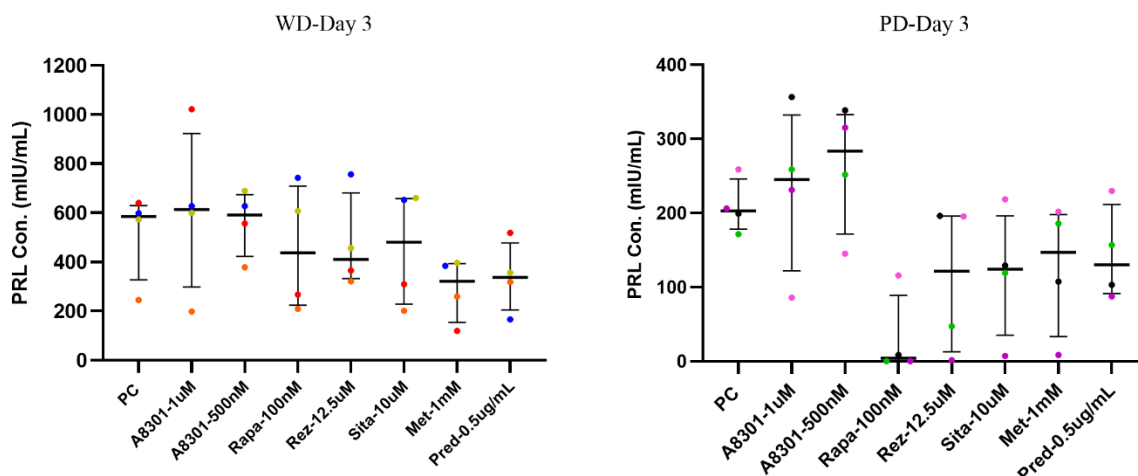
در روز ۳ مقایسه آماری میان سطح پرولاکتین پس از تیمار با Met 1mM با گروه کنترل PC با $p\text{ val} = 0.0391$ و مقایسه آماری میان سطح پرولاکتین پس از تیمار با پردنیزولون با گروه کنترل PC با $p\text{ val} = 0.0391$ معنی دار است.

در روز ۶ مقایسه آماری میان سطح پرولاکتین پس از تیمار با ۱۰uM سیتاگلیپتین با گروه کنترل PC با $p\text{ val} = 0.0391$ معنی دار است.

Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

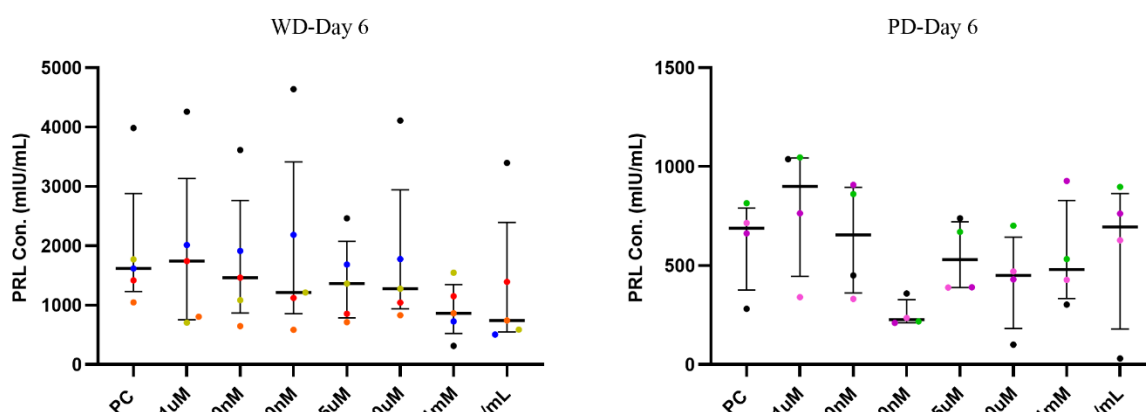
همانطور که در نمودار روز ۳ مشخص است، A8301 چه در غلظت بالا (۱ میکرومولار) چه در غلظت پایین (۵۰۰ نانومولار) و رزوراترول با غلظت پایین (۱۲.۵ میکرومولار) سبب افزایش سطح پرولاکتین می شود. راپامایسین، سیتاگلیپتین، متفورمین و پردنیزولون در غلظت پایین سبب افت غلظت پرولاکتین خواهد شد (غلظت ها در بالا توضیح داده شدند).

در نمودار روز ۶، نتایج تغییرات سطح پرولاکتین در مورد راپامایسین، سیتاگلیپتین، متفورمین و پردنیزولون همانند روز ۳ می باشد. اما A8301 در غلظت بالا (۱ میکرومولار) سبب عدم تغییر و در غلظت پایین (۵۰۰ نانومولار) سبب کاهش سطح پرولاکتین خواهد شد. بعلاوه رزوراترول در غلظت پایین (۱۲.۵ میکرومولار) سبب افت غلظت پرولاکتین می شود.



جهت بررسی تفاوت اثر عوامل senomorphic بر روی سلول های PD و WD نمودارها به صورت زیر ارائه می شود:

- اثر Pretreatment عوامل senomorphic بر دسی جوالیزیشن سلول های مزانشیمی اندومتر:
- **A8301 با غلظت ۱ میکرومولار:** الگوی تغییرات در هر دو سلول های WD و PD مشابه است. اختلاف ها هم در روز ۳ و هم در روز ۶ نسبت به گروه کنترل PC در سلول های PD بیشتر است.
- **A8301 با غلظت ۵۰۰ نانومولار:** در مورد سلول های WD روز ۳ و ۶ و سلول های PD روز ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن تفاوتی در غلظت پرولاکتین میان گروه تیمار شده با گروه کنترل PC وجود ندارد.
- **راپامایسین:** راپامایسین سبب مرگ سلول ها و افت غلظت پرولاکتین می شود که این اثر در سلول های PD جالب توجه تر است.

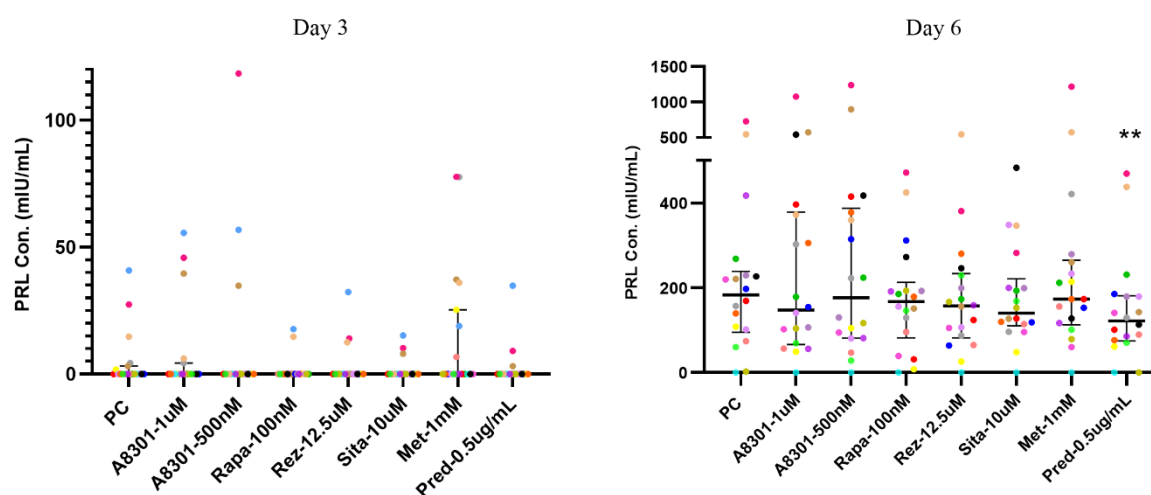


شکل ۳۲. مقایسه اثر عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سوریس های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر در روز ۳ و ۶

پس از القای دسی جوالیزیشن

Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

- متفورمین: متفورمین نیز سبب مرگ سلول ها و افت غلظت پرولاکتین می شود.
 - رزوراترول و سیتاگلیپتین: روی سلول های WD تغییر چندانی ایجاد نمی کند اما در سلول های PD سبب افت غلظت پرولاکتین می شود.
 - پردنیزولون: به استثنای روز ۶ سلول های PD که تغییری در سطح پرولاکتین نسبت به گروه PC ایجاد نمی شود، در روز ۳ و ۶ در سلول های WD و روز ۳ سلول های PD افت غلظت پرولاکتین را شاهد هستیم.
- پروتکل pretreatment مشابهی بر روی سلول های بنیادی خون قاعدگی نیز مورد بررسی قرار گرفت.
- در ابتدا اثر عوامل سنومورفیک بر روی کلیه سوره های بنیادی خون قاعدگی در روز ۳ و ۶ پس از القا نمایش داده می شود.



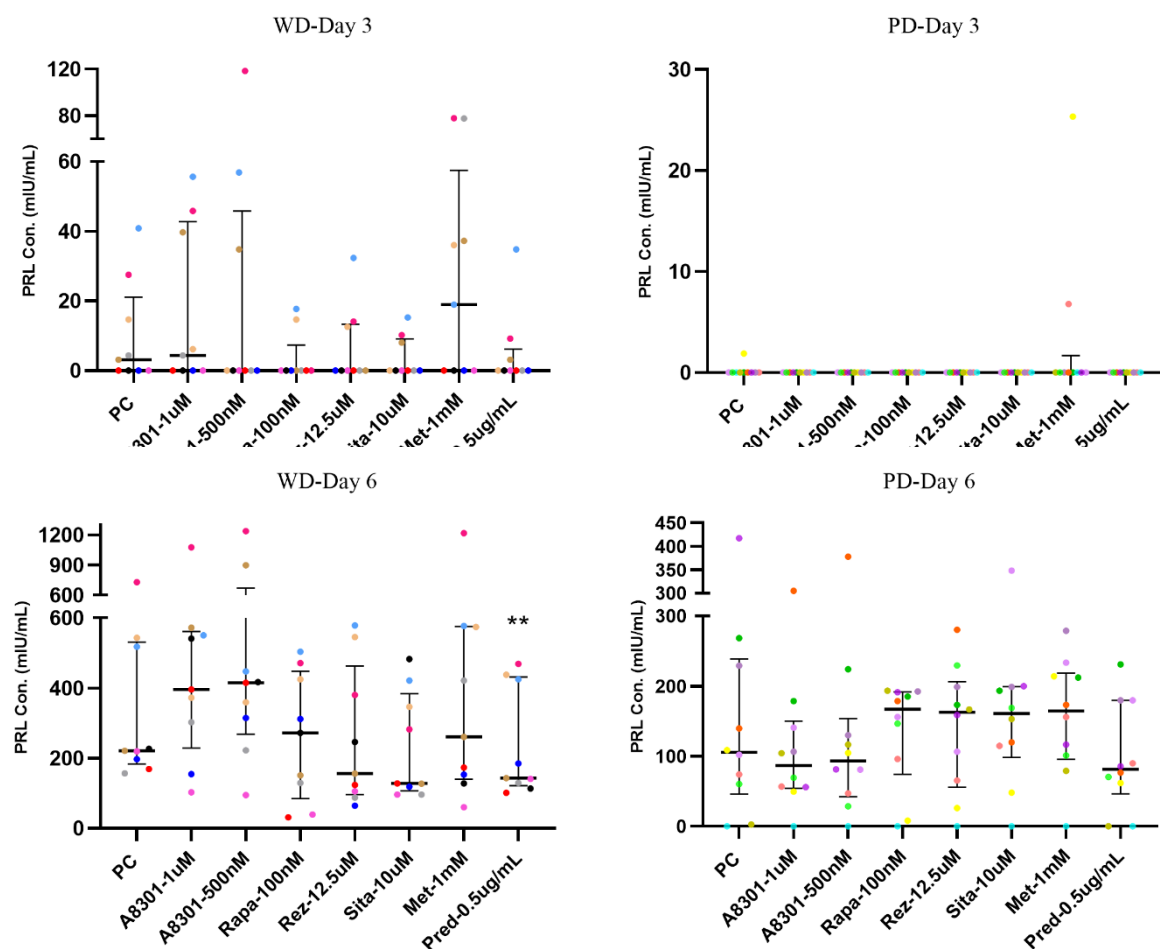
شکل ۳۳. اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعدگی ۳ و ۶ روز پس از القای دسی جوالیزیشن

در روز ۶ مقایسه آماری میان گروه پردنیزولون با گروه کنترل PC با $p\text{ val} = 0.0032$ معنی دار می باشد.

Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون



در روز ۳ اکثر سورها های سلول های بنیادی خون قاعدگی تولید پرولاکتین نداشتند که احتمالاً این سلول ها حساسیت متفاوتی با سلول های مزانشیمی اندومتر دارند و از آن جا که در پروتکل pretreatment سلول ها پیش از القای دسی جوالیزیشن ۵ روز با ماده تیمار می شوند و پس از آن ۲ روز رست هورمونی داده می شوند احتمالاً تولیداتشان با تاخیر اتفاق می افتد. سپس اثر پروتکل pretreatment در سورها های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی به تفکیک نمایش داده شد.



شکل ۳۴. مقایسه اثر پروتکل pretreatment با عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سوره های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوآلیزیشن

مقایسه آماری غلظت پرولاکتین میان pretreatment سوره های WD با پردنیزولون در روز ۶ با گروه کنترل PC با $p\text{ val} = 0.0039$ معنی دار است.

Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

مقایسه اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در کلیه سوره های سلولی مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی

MenSC	MenSC	hEnSC	hEnSC	نام ماده senomorphic و غلظت آن
-------	-------	-------	-------	--------------------------------



PC Day6	PC Day 3	PC Day 6	PC Day 3	
کاهش اندک	عدم تولید	عدم تغییر	افزایش	A8301 غلظت ۱ میکرومولار
افزایش اندک	عدم تولید	کاهش اندک	افزایش	A8301 غلظت ۵۰۰ نانومولار
کاهش اندک	عدم تولید	کاهش شدید	کاهش اندک	راپامایسین غلظت ۱۰۰ نانومولار
کاهش	عدم تولید	کاهش	کاهش اندک	سیتاگلیپتین غلظت ۱۰ میکرومولار
کاهش	عدم تولید	کاهش	کاهش اندک	پردنیزولون غلظت ۰.۵ میکروگرم در میلی لیتر
کاهش اندک	عدم تولید	کاهش	کاهش اندک	متفورمین غلظت ۱ میلی مولار
کاهش اندک	عدم تولید	کاهش شدید	افزایش	رزوراترول غلظت ۱۲.۵ میکرومولار

مقایسه اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین در سورس های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی

جدول مربوط به نتایج اثر پروتکل pretreat عوامل senomorphic بر سورس های WD

WD MenSC PC Day6	WD MenSC PC Day 3	WD hEnSC PC Day 6	WD hEnSC PC Day 3	نام ماده senomorphic و غلظت آن
افزایش	عدم تولید	افزایش اندک	افزایش اندک	A8301 غلظت ۱ میکرومولار
افزایش	عدم تولید	کاهش اندک	افزایش اندک	A8301 غلظت ۵۰۰ نانومولار
افزایش	عدم تولید	کاهش	بدون تغییر	راپامایسین غلظت ۱۰۰ نانومولار
کاهش	عدم تولید	کاهش	افزایش اندک	سیتاگلیپتین غلظت ۱۰ میکرومولار
کاهش	عدم تولید	کاهش	کاهش	پردنیزولون غلظت ۰.۵ میکروگرم در میلی لیتر
افزایش	عدم تولید	کاهش	کاهش	متفورمین غلظت ۱ میلی مولار
کاهش	عدم تولید	کاهش	کاهش	رزوراترول غلظت ۱۲.۵ میکرومولار

جدول مربوط به نتایج اثر پروتکل pretreat عوامل senomorphic بر سورس های PD

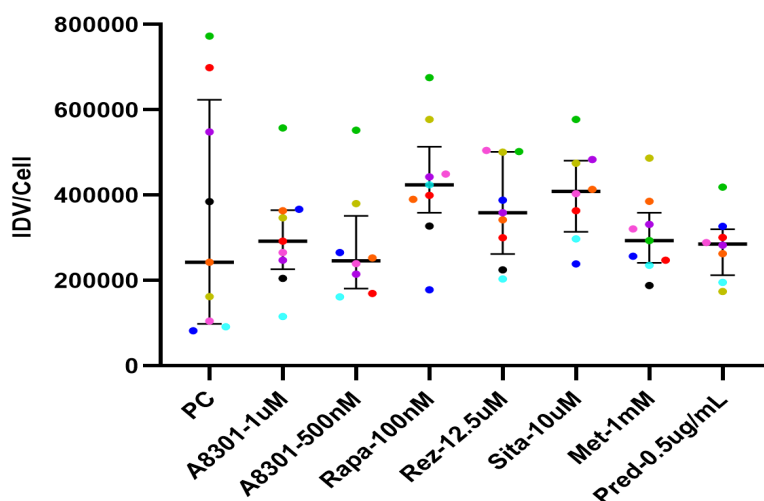
PD MenSC PC Day6	PD MenSC PC Day 3	PD hEnSC PC Day 6	PD hEnSC PC Day 3	نام ماده senomorphic و غلظت آن
کاهش	عدم تولید	افزایش	افزایش	A8301 غلظت ۱ میکرومولار
کاهش اندک	عدم تولید	کاهش اندک	افزایش	A8301 غلظت ۵۰۰ نانومولار
افزایش	عدم تولید	کاهش	عدم تولید	راپامایسین غلظت ۱۰۰ نانومولار
افزایش	عدم تولید	کاهش	کاهش	سیتاگلیپتین غلظت ۱۰ میکرومولار
کاهش	عدم تولید	افزایش اندک	کاهش	پردنیزولون غلظت ۰.۵ میکروگرم در میلی لیتر
افزایش	عدم تولید	کاهش	کاهش	متفورمین غلظت ۱ میلی مولار
افزایش	عدم تولید	کاهش	کاهش	رزوراترول غلظت ۱۲.۵ میکرومولار

همان طور که پیش از این گفته شد از آن جا که سلول های بنیادی خون قاعدگی در روز ۳ پس از تمایز در پروتکل pretreatment قادر به تولید پرولاکتین نبوده اند لذا مقایسه آن با سلول های مزانشیمی اندومتر امری غیرمعقول به نظر می رسد. در مقایسه کلی اثر عوامل senomorphic بر دسی جوالیزیشن سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی در روز ۶ می توان گفت در مورد راپاماسین، سیتاگلیپتین، پردنیزولون، متفورمین و رزوراترول جهت تغییرات میان دو سورس سلولی همسو می باشد. اما پس از تفکیک نتایج سورس ها چه از منشا سلول های مزانشیمی اندومتر و چه از منشا سلول های بنیادی خون قاعدگی می بینیم که در سورس های WD در روز ۶ پس از تیمار با مواد A8301 با غلظت ۱ میکرومولار، سیتاگلیپتین، پردنیزولون و رزوراترول جهت تغییرات در سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی همسو بوده و در مورد A8301 با غلظت ۵۰۰ نانومولار، راپاماسین و متفورمین جهت تغییرات ناهمسو می باشد. در خصوص سورس های PD، به جز ماده A8301 با غلظت پایین، در مورد سایر مواد جهت تغییرات در مقایسه دو سورس مختلف اندومتر و خون قاعدگی ناهمسو می باشد.

در مقایسه سورس های PD و WD از منشا مزانشیم اندومتر، در روز ۳ جهت تغییرات همه مواد به جز سیتاگلیپتین همسو می باشد. مقایسه مشابهی در روز ۶ بر روی این سلول های مزانشیمی اندومتر انجام شد که مشخص شد به جز پردنیزولون جهت تغییرات همه مواد همسو می باشد.

در مقایسه سورس های PD و WD از منشا سلول های بنیادی خون قاعدگی، در روز ۳ که بعلت عدم تولید قادر به مقایسه نیستیم. و اما در روز ۶ به جز راپاماسین، پردنیزولون و متفورمین که جهت تغییرات غلظت پرولاکتین پس از تیمار با این مواد در بین دو سورس WD و PD همسو بود در مورد سایر مواد جهت تغییرات ناهمسو گزارش می شود.

۱۴-۳- ارزیابی اثر عوامل senomorphic پروتکل pretreatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در کلیه سورس های سلولی مزانشیمی اندومتر



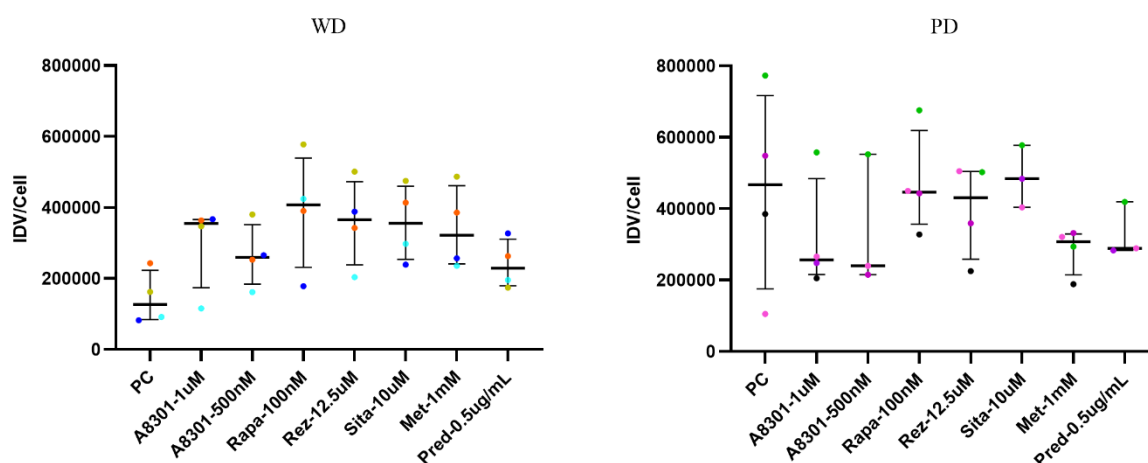
شکل ۳۵. اثر pretreatment عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز

مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر

Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

نمودار بالا نشان می دهد که pretreatment سلول های مزانشیمی اندومتر با عوامل senomorphic سبب افزایش پیری در این سلول ها می شود که به دلیل تنوع بالای پاسخ هر سورس و انحراف معیار بالا این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار نمی باشد.

۱۵-۳ مقایسه اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر میزان پیری در سورس های PD و WD سلول های مزانشیمی اندومتر



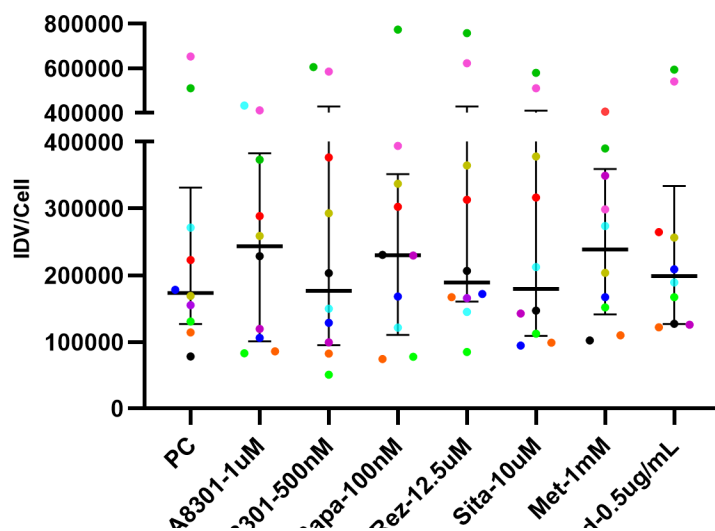
شکل ۳۶. مقایسه اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سورس های PD و WD سلول های

مزانشیمی اندومتر

Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

نمودارهای بالا نشان می دهد که pretreatment عوامل senomorphic سبب افزایش فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سورس های WD و کاهش آن (بجز سیتاگلیپتین) در سورس های PD می شود.

۱۶-۳ ارزیابی اثر عوامل senomorphic پروتکل pretreatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در کلیه سورس های سلولی بنیادی قاعدگی



شکل ۳۷. اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با

پیری در سلول های بنیادی خون قاعدگی

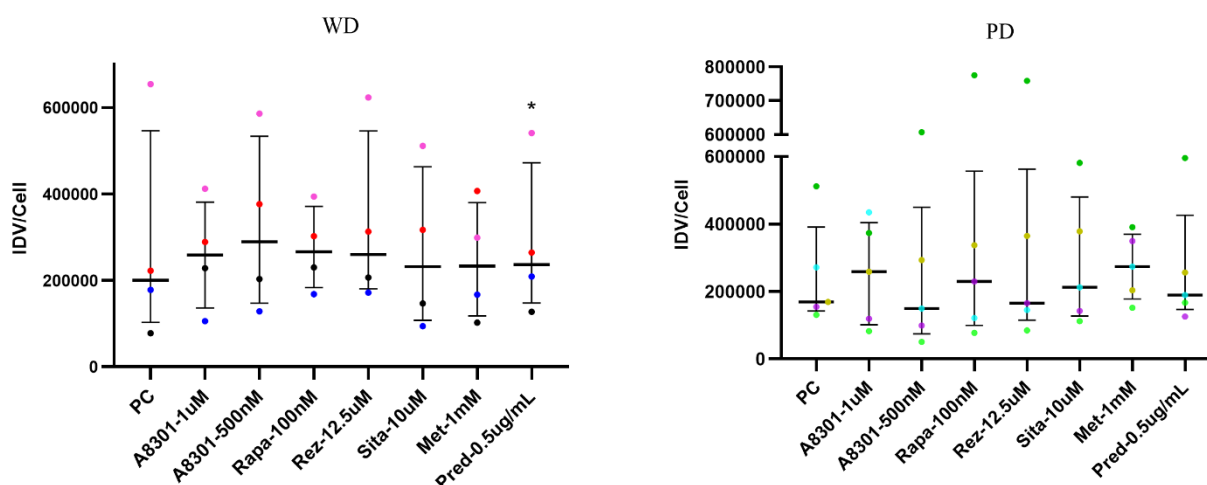
Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

نمودار بالا مشخص

همان گونه که در

است بجز A8301 با غلظت ۵۰۰ نانومولار، رزوراترول و سیتاگلیپتین، در مورد سایر عوامل senomorphic، pretreatment سبب افزایش فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در کلیه سورس های سلول های بنیادی خون قاعدگی می شود.

۱۷-۳- مقایسه اثر پروتکل pretreatment عوامل senomorphic بر میزان پیری در سوره های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی



شکل ۳۸. مقایسه اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سوره های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی

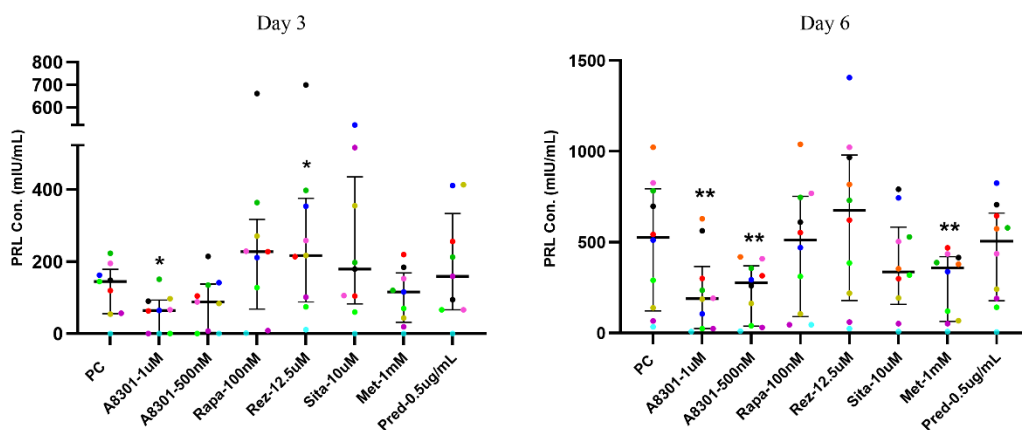
مقایسه آماری pretreatment با پردنیزولون با گروه کنترل PC در سوره های WD سلول های بنیادی خون قاعدگی با $p\text{ val} = 0.0313$ معنی دار است

R: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سینتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

همانگونه که از نمودارهای بالا مشخص است، pretreatment عوامل senomorphic سبب افزایش فعالیت بتاگالاکتوزیداز در سوره های WD می شود و الگوی سوره های PD مشابه الگوی مربوط به کلیه سوره های سلولی بنیادی خون قاعدگی می باشد.

۱۸-۳- ارزیابی اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعدگی

همان گونه که پیش از این گفته شد پروتکل treatment در سلول های مزانشیمی اندومتر در آزمایش های متناوب و تکرار پذیر سبب عدم تولید پرولاکتین شد. لیکن به دلیل تفاوت این سلول ها با سلول های بنیادی خون قاعدگی اثر عوامل senomorphic همزمان با القای دسی جوالیزیشن سبب تغییراتی در غلظت پرولاکتین شد که در نمودار زیر قابل مشاهده است.



شکل ۳۹. اثر پروتکل treatment عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعد

۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن

در روز ۳ مقایسه آماری میان غلظت پرولاکتین پس از تیمار با A8301 ۱uM با گروه کنترل PC با $val = 0.0156$ آماری میان تیمار با روزراترول ۱۲.۵ uM با گروه کنترل PC با $val = 0.0273$ معنی دار می باشد.

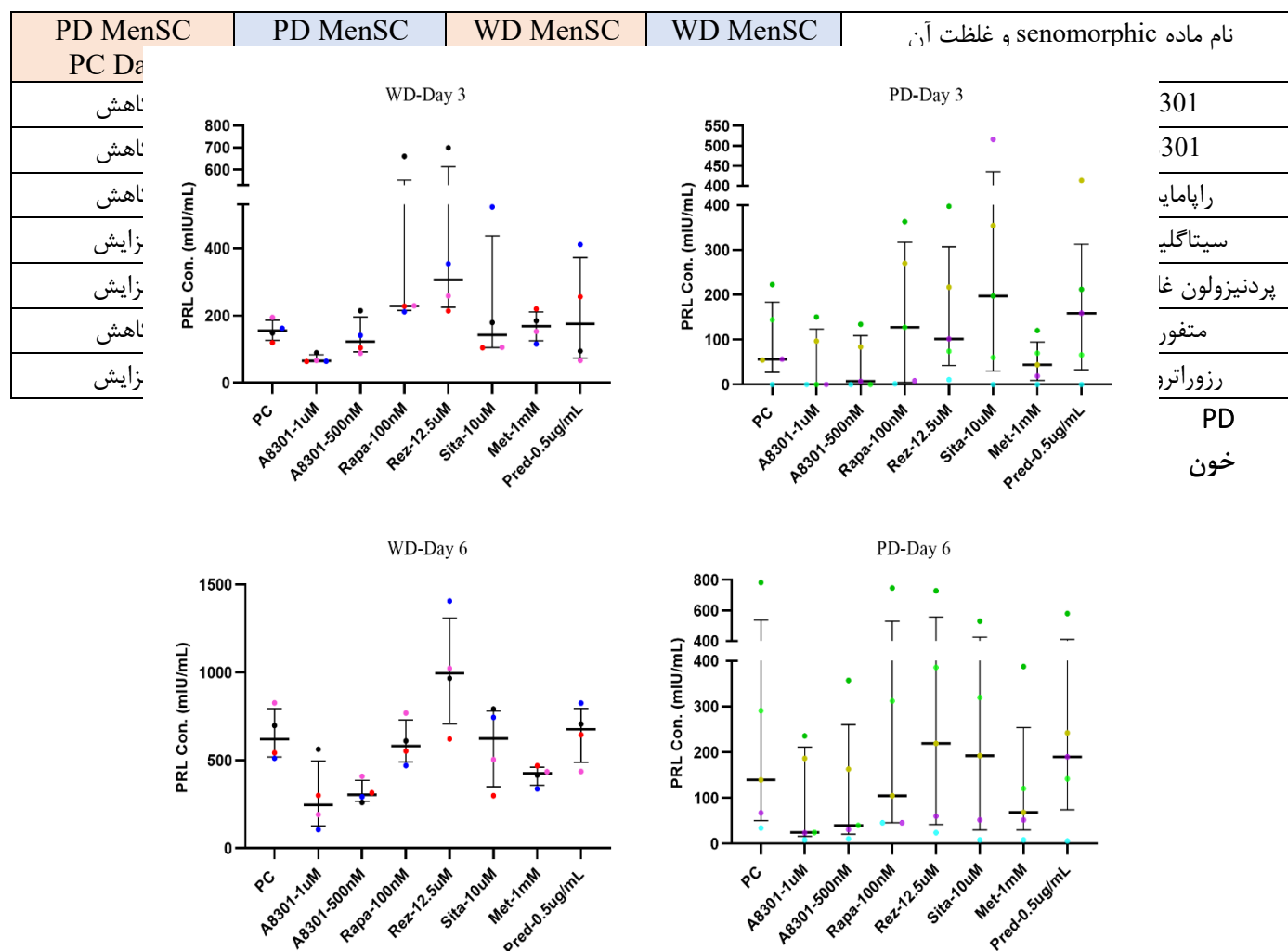
در روز ۶ مقایسه آماری میان غلظت پرولاکتین پس از تیمار با A8301 ۱uM با گروه کنترل PC با $val = 0.0098$ تیمار با A8301 ۵۰۰nM و گروه کنترل PC با $val = 0.0039$ و میان تیمار با متفورمین ۱mM و گروه کنترل جز راپامایسن، سیتاگلیپتین و $val = 0.002$ معنی دار می باشد.

پردنیزولون جهت تغییرات پس از تیمار با عوامل Rapa: راپامایسن; Rez: روزراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

senomorphic نسبت به کنترل PC در روز ۳ و روز ۶ یکسان است که در جدول زیر ارائه می شود.

MenSC PC Day6	MenSC PC Day 3	نام ماده senomorphic و غلظت آن
کاهش	کاهش	A8301 غلظت ۱ میکرومولار
کاهش	کاهش	A8301 غلظت ۵۰۰ نانومولار
عدم تغییر	افزایش	راپامایسن غلظت ۱۰۰ نانومولار
کاهش	افزایش	سیتاگلیپتین غلظت ۱۰ میکرومولار
عدم تغییر	افزایش	پردنیزولون غلظت ۰.۵ میکروگرم در میلی لیتر
کاهش	کاهش	متفورمین غلظت ۱ میلی مولار
افزایش	افزایش	روزراترول غلظت ۱۲.۵ میکرومولار

۳-۱۹- مقایسه اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر غلظت پرولاکتین سلول های WD و



شکل ۴۰. مقایسه اثر عوامل senomorphic بر غلظت پرولاکتین سلول های بنیادی خون قاعدگی در

روز ۳ و ۶ پس از القای دسی جوالیزیشن

Rapa: راپامایسین; Rez: رزوراترول; Sita: سیتاگلیپتین; Met: متفورمین; Pred: پردنیزولون

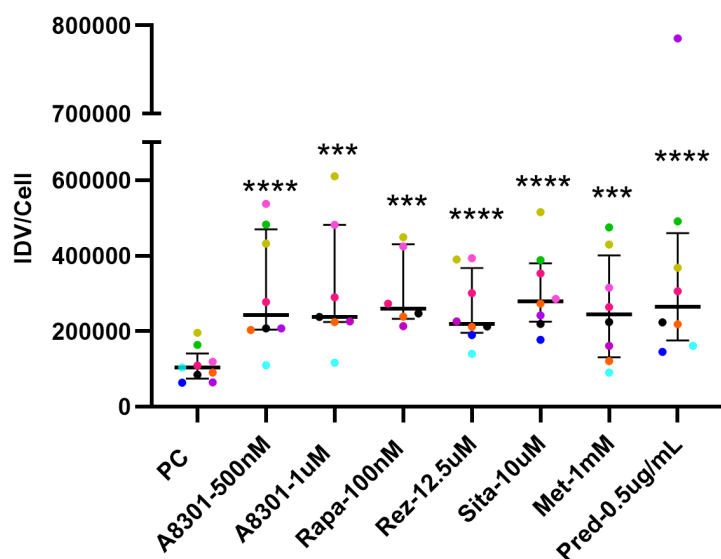
قاعدگی

از نتایج موجود در جدول قابل استناد است که تغییرات به جز در مورد سیتاگلیپتین و پردنیزولون، در مورد سایر مواد جهت تغییرات غلظت پرولاکتین میان سورس های WD و PD چه در روز ۳ و چه در روز ۶ همسو می باشد.

۲۰-۳- ارزیابی اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری

در سلول های مزانشیمی اندومتر

اگرچه پروتکل treatment عوامل سنومورفیک در سلول های مزانشیمی اندومتر سبب عدم تولید پرولاکتین می شود لیکن سطح پیری در این سلول ها براساس فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری قابل اندازه گیری بود که در نمودار زیر ابتدا نتایج مربوط به کلیه سوری ها قابل مشاهده است.



شکل ۴۱. اثر پروتکل treatment عوامل senomorphic بر شدت

فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی

اندومتر

گزارش معنی داری مقایسه دو به دو گروه ها

مقایسه آماری تیمار با A8301 ۵۰۰nM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۰۱ >$

مقایسه آماری تیمار با A8301 ۱uM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۰۲ >$

مقایسه آماری تیمار با راپامایسین ۱۰۰nM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۰۵ >$

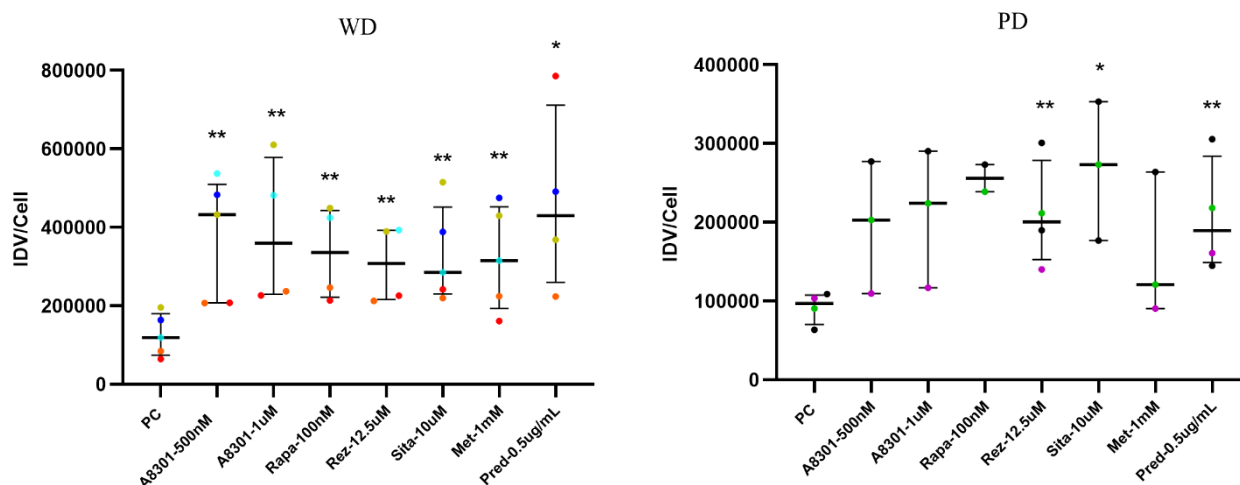
مقایسه آماری تیمار با ۱۲.۵uM رزوراترول با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۰۱ >$

مقایسه آماری تیمار با ۱۰uM سیتاگلیپتین با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۰۱ >$

مقایسه آماری تیمار با ۱mM متفورمین با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۰۳ >$

همانگونه که مشخص است عوامل سنومورفیک سبب افزایش میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های مزانشیمی اندومتر می شود که این افزایش درمورد همه مواد به لحاظ آماری معنی دار است.

۲۱-۳- مقایسه اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر



شکل ۴۲. مقایسه پروتکل treatment عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سوره های WD و PD سلول های مزانشیمی اندومتر

در سوره های WD مقایسه آماری گروهها به این صورت است:

مقایسه آماری تیمار با A8301 ۵۰۰nM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۲$

مقایسه آماری تیمار با A8301 ۱ uM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۷۸$

مقایسه آماری تیمار با راپامایسین ۱۰۰nM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۷۸$

مقایسه آماری تیمار با رزوراترول ۱۲.۵uM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۷۸$

مقایسه آماری تیمار با سیتاگلیپتین ۱۰uM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۳۹$

مقایسه آماری تیمار با متفورمین ۱mM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۳۹$

مقایسه آماری تیمار با پردنیزولون ۰.۵ ug/ML با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۱۵۶$

در سوره های PD مقایسه آماری گروهها به این صورت است:

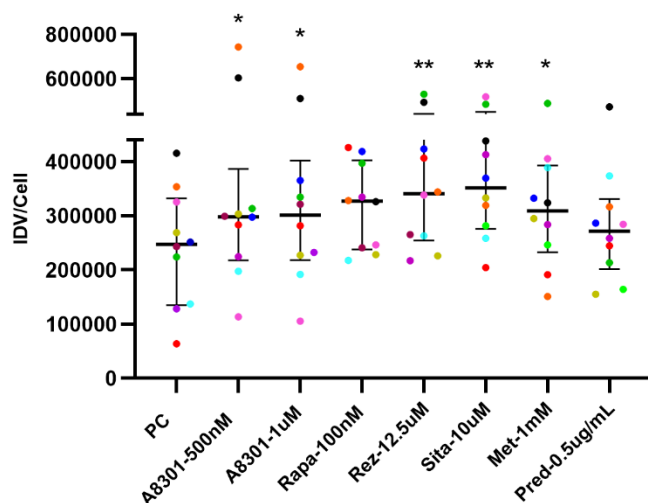
مقایسه آماری تیمار با ۱۲.۵ uM رزوراترول با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۷۸$

مقایسه آماری تیمار با ۱۰uM سیتاگلیپتین با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۳۱۳$

مقایسه آماری تیمار با ۰.۵ ug/mL پردنیزولون با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۷۸$

همانگونه که از نمودارهای بالا مشخص است اثر عوامل سنومورفیک با پروتکل treatment بر روی فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD و PD مزانشیمی اندومتر اثر افزایشی می باشد.

۲۲-۳- ارزیابی اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در کلیه سورس های سلول های بنیادی خون قاعدگی



شکل ۴۳. اثر عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری سلول

بنیادی خون قاعدگی

مقایسه آماری تیمار با A8301 500nM و گروه کنترل PC: $P\text{ val} = 0.0136$

مقایسه آماری تیمار با A8301 1uM و گروه کنترل PC: $P\text{ val} = 0.0328$

مقایسه آماری تیمار با 12.5uM رزوراترول و گروه کنترل PC: $P\text{ val} = 0.0027$

مقایسه آماری تیمار با 10uM سیتاگلیپتین و گروه کنترل PC: $P\text{ val} = 0.002$

مقایسه آماری تیمار با 1mM متفورمین و گروه کنترل PC: $P\text{ val} = 0.0484$

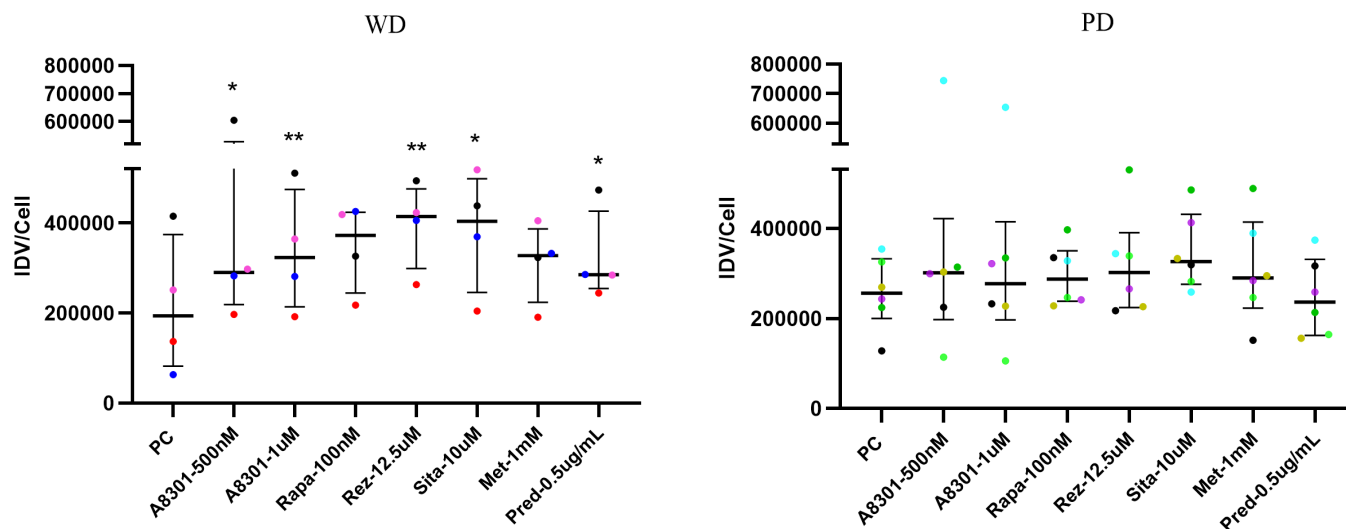
همانگونه که از نمودار

مشخص است همانند

سلول های مزانشیمی

اندومتر، اثر عوامل senomorphic بر فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های بنیادی خون قاعدگی نیز اثر افزایشی است.

۲۲-۳- مقایسه اثر عوامل senomorphic در پروتکل treatment بر میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سلول های WD و PD بنیادی خون قاعدگی



لازم به ذکر است در فاز سل ترایی، کلیه سلول های بنیادی خون قاعدگی که قرار است در کارآزمایی بالینی به جامعه هدف این مطالعه تزریق شود کلیه مطالعات کنترل کیفی بر روی آن انجام شده و در بانک سلولی ذخیره شد. در حال حاضر سلول هایی که براساس نتایج حاصل از مطالعات *in vitro* انتخاب شدند، کشت انبوه داده شده، فریز شدند و اکنون در وضعیت patient recruitment هستیم.

شکل ۴۴. مقایسه اثر treatment عوامل senomorphic بر شدت فعالیت بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری در سورس های WD و PD سلول های بنیادی خون قاعدگی

در سورس های WD

مقایسه آماری تیمار A8301 ۵۰۰nM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۱۵۶$

مقایسه آماری تیمار A8301 ۱uM با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۷۸$

مقایسه آماری تیمار ۱۲.۵uM رزوراترول با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۰۷۸$

مقایسه آماری تیمار ۱۰uM سیتاگلیپتین با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۱۵۶$

مقایسه آماری تیمار ۰.۵ug/mL پردنیزولون با گروه کنترل PC: $p\text{ val} = ۰.۰۲۳۴$



آزمایش های لازم الاجرا در آینده که نتایج آن در گزارش نهایی طرح ارائه خواهد شد:

- بررسی غلظت IL-6 و IL-8 در سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی قبل و بعد از القای دسی جوالیزیشن
- بررسی غلظت گلوکز و لاکتات در سلول های بنیادی خون قاعدگی قبل و پس از القای دسی جوالیزیشن
- بررسی اثر عوامل senomorphic بر غلظت IL-6, IL-8, گلوکز و لاکتات در سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی
- ایمونوفنوتاایپینگ سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول های بنیادی خون قاعدگی به لحاظ درصد بیان HLA-ABC, HLA-DR, HLA-G در مقایسه دو حالت قبل و بعد از القای دسی جوالیزیشن و حالت دسی جوالیزیشن با و بدون حضور IFN- γ
- ارزیابی شاخص circularity در سلول های بنیادی خون قاعدگی قبل و بعد از دسی جوالیزیشن
- تزریق داخل رحمی سلول های بنیادی خون قاعدگی بعد از تکثیر و تمایز به جامعه هدف و پایش شاخص های بالینی تعریف شده در مطالعه