مقایسه اثر داروهای لتروزول و رالوکسیفن بر سلول‌های استرومای آندومتر انسانی در محیط کشت

دکتر مریم پورحیدر[۱]، دکتر زهرا رشیدی[۲]، دکتر مظفر خزاعی[۳*]

۱. دکترای تخصصی بافت‌شناسی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. استادیار، دکتری تخصصی بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۳. استاد، دکتری تخصصی علوم تشریحی، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۵/۰۶

خلاصه

مقدمه: لتروزول و رالوکسیفن از داروهای مورد استفاده در بیماری‌های تولید مثل زنانه می‌باشند که هر یک دارای خواص و عوارض اختصاصی هستند. مطالعه حاضر با هدف مقایسه اثر داروی لتروزول و رالوکسیفن بر سلول‌های استرومای آندومتر انسانی در محیط کشت انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۸، بر ۱۶ نمونه بیوپسی آندومتر زنان دارای سیکل‌های قاعدگی نرمال و در فاز ترشحی انجام شد. هر بیوپسی پس از خرد کردن، تحت اثر آنزیم کلاژناز I قرار گرفت. سلول‌های استروما با استفاده از صافی‌های سلولی ۷۰ و ۴۰ میکرونی و لایه‌گذاری بر فیکول جدا و با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (آنتی ویمنتین) تأیید شدند. سلول‌های حاصل از هر بیوپسی به گروه‌های کنترل و لتروزول و یا گروه‌های کنترل و رالوکسیفن تقسیم شدند. در پایان دوره کشت (۱۵ روز)، سلول‌ها از نظر قابلیت زیست و مورفولوژی بررسی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و تست توکی انجام شد.

یافته‌ها: تعداد سلول‌ها در گروه‌های کنترل و لتروزول ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار به‌ترتیب ۱۴/۷، ۷/۸، ۵/۶ و ۴/۲ در 10^4 و در گروه‌های کنترل و رالوکسیفن ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار به‌ترتیب ۲۱/۸، ۱۲/۹، ۹/۱، ۳ در 10^4 بود و اختلاف آنها معنی‌دار بود ($p<0/05$). نمره تغییرات مورفولوژی در گروه‌های کنترل و لتروزول به‌ترتیب ۳/۸۶، ۳/۳۸، ۲/۶۸ و ۲/۰۸ و در گروه‌های کنترل و رالوکسیفن به‌ترتیب ۳/۹۸، ۳/۷۷، ۳/۷۲ و ۱/۱۸ بود که اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). اثر لتروزول و رالوکسیفن بر قابلیت زیست و مورفولوژی سلول های استرومای آندومتر متفاوت بود.

نتیجه‌گیری: لتروزول و رالوکسیفن اثر ضدتکثیری وابسته به دوز بر سلول‌های استرومای آندومتر انسانی در محیط کشت دارند و اثر رالوکسیفن شدیدتر از لتروزول است.

کلمات کلیدی: آندومتر، رالوکسیفن، سلول‌های استروما، لتروزول

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر مظفر خزاعی؛ مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
تلفن: ۰۸۳-۳۴۲۷۴۶۱۸؛ **پست الکترونیک**: mkhazaei1345@yahoo.com

مقدمه

آندومتر انسانی بافت ویژه منحصر به‌فردی است که در سیکل‌های ماهیانه، تحت اثر استروئیدهای تخمدانی (استروژن و پروژسترون) و دیگر فاکتورهای تنظیمی تغییراتی شامل تکثیر، ترمیم، تمایز و ریزش را می‌گذراند (۱). این تغییرات در جمعیت سلولی آندومتر شامل سلول‌های اپی‌تلیال و فیبروبلاست‌های استروما و سلول-های اندوتلیال جدار عروق اتفاق می‌افتد (۲). سلول‌های استروما در بافت همبند سست آندومتر به‌ویژه لایه عملکردی سطحی واقع شده‌اند و در طی فرآیند دسیدوالیزاسیون، بزرگ و چندوجهی و مملو از چربی و گلیکوژن شده و سلول دسیدوایی نامیده می‌شوند. این سلول‌ها در تعدادی از بیماری‌های آندومتر مانند آندومتریوز، آدنومیوز و تومورهای خوش‌خیم و بدخیم آندومتر نقش محوری دارند (۳).

مطالعه و بررسی اثرات داروهای مؤثر در بیماری‌های زنان و مامایی و تحقیق در مورد تأثیر این داروها بر سلول‌های آندومتر برای جلوگیری و یا کاهش عوارض جانبی آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. از طرفی استروژن درمانی با وجود آثار مثبت، دارای اثرات منفی مانند افزایش سرطان پستان و آندومتر و حوادث ترومبوآمبولیک می‌باشد و به‌دلیل این عوارض، پزشکان با احتیاط آن را تجویز می‌کنند. لتروزول و رالوکسیفن، از داروهایی هستند که در درمان بیماری‌های زنان استفاده می‌شوند. لتروزول یک مهارکننده غیراستروئیدی آنزیم آروماتاز است که در تحریک تخمک‌گذاری در زنان نابارور استفاده می‌شود (۴) و در درمان بیماری‌های وابسته به استروژن مانند سرطان پستان (۵) نیز به‌کار رفته و برای مهار آندومتریوز (۶) توصیه شده است. آنزیم آروماتاز در آندومتریوز و سرطان‌های رحم و جفت و سرطان پستان بیان می‌شود (۷). طی سال‌های اخیر مهار کننده‌های آروماتاز بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات به‌طور اختصاصی تولید موضعی استروژن‌ها را متوقف ساخته و در درمان بیماری‌های وابسته به استروژن استفاده می‌شوند (۵).

رالوکسیفن یکی از داروهای تعدیل کننده انتخابی گیرنده‌های استروژن (SERM)[1] است که در سال ۱۹۹۹ معرفی شد (۸). این دارو دارای اثرات ضداستروژنی بر بافت پستان و رحم است (۹) و باعث کاهش ۹۰٪ سرطان پستان می‌شود (۱۰). در زنان پس از یائسه، رالوکسیفن برای درمان پوکی استخوان و درمان میوم‌های رحمی (۱۱) استفاده می‌شود. از طرفی اثرات مثبت رالوکسیفن در کاهش سرطان آندومتر و پستان نیز معرفی شده است (۱۲، ۱۳). رالوکسیفن باعث مهار بیان گیرنده‌های استروژنی در سلول‌های استرومای آندومتر و پروتئین Ki67، به‌عنوان مارکر تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۴، ۱۵).

دو داروی لتروزول و رالوکسیفن در پزشکی تولیدمثل کاربردهای متنوعی دارند، برای کنترل بیماری‌های وابسته به استروژن مانند سرطان پستان و آندومتر و آندومتریوز می‌توان با استفاده از بلوک کردن گیرنده‌های استروژن، رشد سلول‌ها را مهار کرد (۱۶). یانایهارا و همکاران (۲۰۰۵) بیان ژن‌های مختلف در سلول‌های استروما و اپی‌تلیال آندومتر در محیط کشت را بررسی و تأثیر استروژن و نقش مهم آن در ترمیم و بازسازی آندومتر را گزارش کردند (۱۷). همچنین احتمالاً لتروزول بر درمان آندومتریوز مؤثر است و باعث کاهش علائم پاتولوژیک آن می‌شود (۶).

بنابراین با توجه به نقش محوری سلول‌های استروما آندومتر در فیزیوپاتولوژی تومورها و سایر اختلالات آندومتری نظیر آندومتریوز و آدنومیوز، مطالعات بیشتری در زمینه کشت سلولی مورد نیاز است تا بتوان نتایج حاصل از تحقیقات برون تن (*in vitro*) درباره آثار داروهای لتروزول و رالوکسیفن را در درمان بیماری‌های تولید مثل زنانه مقایسه نمود، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر دوزهای مختلف داروهای لتروزول و رالوکسیفن بر تعداد و مورفولوژی سلول‌های استرومای آندومتر انسانی در محیط کشت انجام شد.

[1] selective estrogen receptor modulator

روش‌کار

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۸، بر نمونه‌های بیوپسی آندومتر زنان در سنین باروری (۴۰-۳۰ سال) دارای سیکل‌های باروری نرمال در فاز ترشحی (روزهای ۲۳-۱۹ دوره ماهیانه) که برای تشخیص علل ناباروری به مرکز درمانی دانشگاه مراجعه و یک‌بار بیوپسی شده بودند و بافت مازاد آنها در تانک ازت مرکز تحقیقات باروری و ناباروری نگهداری می‌شد، انجام گرفت. در زمان بیوپسی، بخشی از هر نمونه جهت تشخیص پاتولوژی و بخش دیگر با استفاده از محافظت کننده انجمادی، برای مطالعات تکمیلی منجمد گردید. فقط داده‌های مربوط به بیوپسی‌هایی که نرمال و در فاز ترشحی بودند، وارد مطالعه شدند. در مجموع در این مطالعه ۱۶ نمونه بیوپسی آندومتر زنان استفاده شد که ۸ نمونه برای غلظت‌های مختلف لتروزول و ۸ نمونه برای غلظت‌های رالوکسیفن مختلف به‌کار رفت. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه کار بر بافت انسانی در این مطالعه را پذیرفت (کد اخلاق: IR.KUMS.REC.1398.662) و بیماران فرم رضایت‌نامه را امضاء کردند. معیارهای خروج از مطالعه شامل: نمونه‌های آندومتر دارای پولیپ، هیپرپلازی آندومتر، بدخیمی و هورمون درمانی در سه ماهه قبل از بیوپسی بود.

جداسازی سلول‌های استروما

سلول‌های استروما به روش گزارش شده در مطالعات قبلی (۱۸) از سایر سلول‌های بافت آندومتر جدا شدند. به‌طور خلاصه پس از ۳-۲ بار شستشوی هر بیوپسی با محلول بافر فسفات (PBS)[1] حاوی آنتی‌بیوتیک، هر نمونه به‌مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۱۵۰۰ دور در دقیقه) شد. سپس در یک پتری دیش با استفاده از تیغ بیستوری و در شرایط استریل بافت آندومتر تا حد امکان خرد شد. هضم آنزیمی بافت خرد شده در محیط DMEM-F12 (Gibco) و ۵٪ FBS (Gibco) و کلاژناز نوع I (Sigma) با دوز ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیمی به‌ترتیب از صافی‌های سلولی[2] ۷۰ و ۴۰ میکرونی عبور داده شدند. محلول صاف شده به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه) و رسوب سلولی حاصل با استفاده از محیط کشت (DMEM/F12) شکسته شده و بر فایکول (Amersham, Sweden)، لایه‌گذاری و به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۵۰۰ دور در دقیقه) شد. در ادامه لایه سلولی بین محیط کشت رویی و فایکول جمع‌آوری و محلول نمکی (NaCl) ۰/۱۵ مولار به آن اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰ دور در دقیقه) شد. رسوب سلولی نهایی دارای سلول‌های استرومای آندومتر بود.

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی ضد ویمنتین جهت نشان‌دار کردن سلول‌های استروما و CD31 (مارکر شناسایی سلول‌های آندوتلیال) و آنتی‌سیتوکراتین (مارکر شناسایی سلول‌های اپی‌تلیال) انجام شد (۱۹)؛ بدین‌ترتیب که پس از جداسازی سلول‌های استروما و قبل از شروع کشت، پس از جداسازی سلول‌ها، اسمیرهای سلولی تهیه و به‌ترتیب به‌مدت ۳ دقیقه با الکل ۷۰٪، یک دقیقه با آب و ۲ بار با PBS هر کدام به‌مدت ۵ دقیقه شسته شدند. سپس آنتی‌بادی‌های اولیه به‌طور جداگانه به‌مدت ۲۵ دقیقه به هر لام اضافه شد. لام‌ها دو بار با PBS شسته و به‌مدت ۱۰ دقیقه به آنها بیوتین اضافه شد. پس از شستشو با PBS، به‌مدت ۱۰ دقیقه استرپتوآویدین (شرکت داکو)[3] و سپس کروموژن اضافه شد. رنگ‌آمیزی هسته‌ها به‌مدت ۱۵ ثانیه با هماتوکسیلین انجام و در نهایت آبگیری با الکل انجام و لامل چسبانیده شد (۱۶).

شمارش سلولی

شمارش سلولی با استفاده از رنگ آبی تریپان ۰/۴٪ و لام نئوبار انجام شد. حجم معینی از سوسپانسیون سلولی با حجم برابر از رنگ، مخلوط شدند و سلول‌ها با میکروسکوپ نوری (مدلOlympus CH3O، ژاپن)

[1] Phosphate Buffered Saline

[2] Cell strainer, BD Falcon

[3] Danish cancer diagnostics company, Dako
Dako is a canton and village in the Assoli Prefecture in the Kara Region of north-eastern

توسط ۲ نفر جداگانه شمارش و میانگین گرفته شد. پس از محاسبه تعداد کل سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی از نظر حجم به ۴ ظرف کشت تقسیم شده و به‌طور تصادفی به‌عنوان گروه کنترل و گروه‌های آزمایش (۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار دارو) (۱۷) در نظر گرفته شدند. در شروع کشت که روز صفر محسوب شد، تمام گروه‌ها فقط محیط کشت دریافت کردند. پس از تعویض محیط در روز اول کشت، سلول‌های حاصل از هر بیوپسی با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار یکی از داروهای لتروزول یا رالوکسیفن به‌طور جداگانه تیمار شدند. ظرف‌های کشت هر ۳ روز یک‌بار تعویض محیط و با میکروسکوپ معکوس (Invert, Motic Spain) بررسی و عکسبرداری شدند. در پایان دوره ۱۵ روزه کشت، سلول‌ها از نظر تعداد (قابلیت زیست) و مورفولوژی ارزیابی شدند.

تغییرات مورفولوژی سلول‌ها

برای بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌ها، بررسی و عکسبرداری در روزهای ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ انجام گردید. عکس‌ها با استفاده از نرم‌افزار Motic بررسی و آنالیز شدند. درصد سلول‌های چندوجهی فیبروبلاستی (F) مشخص گردید. تغییرات ایجاد شده در سلول‌ها، نمره دهی (Score) شد و میانگین نمرات، به‌عنوان داده اصلی در نظر گرفته شد.

Score 1: کمتر از ۲۵٪ سلول‌ها حالت فیبروبلاستی

Score 2: ۵۰-۲۵٪ سلول‌ها حالت فیبروبلاستی

Score 3: ۷۵-۵۱٪ سلول‌ها حالت فیبروبلاستی

Score 4: بیش از ۷۵٪ سلول‌ها حالت فیبروبلاستی

داده‌های حاصل از شمارش سلولی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و تست توکی بررسی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی نشان داد که سلول‌های استرومای جدا شده از بافت آندومتر رحم برای مارکر شناسایی سلول‌های آندوتلیال (CD31)[1] و مارکر شناسایی سلول‌های اپی‌تلیال (سیتوکراتین) منفی بوده و برای مارکر شناسایی سلول‌های استروما (وی منتین) رنگ گرفته‌اند که مؤید ماهیت استرومایی سلول‌های آندومتر رحم است (شکل ۱).

تعداد سلول‌ها

میانگین تعداد سلول‌ها در گروه‌های کنترل، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار لتروزول به‌ترتیب ۱۴/۷، ۷/۸، ۵/۶ و ۴/۲ در 10^4 سلول و در داروی رالوکسیفن به‌ترتیب ۲۱/۸، ۱۲/۹، ۹/۱ و ۳ در 10^4 بود و کاهش معنی‌داری وابسته به دوز را نشان دادند ($p<0/05$) (شکل ۲). در هر دو دارو کاهش شدید تعداد سلول‌ها در دوز بالاتر دارو وجود داشت، ولی این کاهش در مورد رالوکسیفن شدیدتر بود.

مورفولوژی سلول‌های استروما

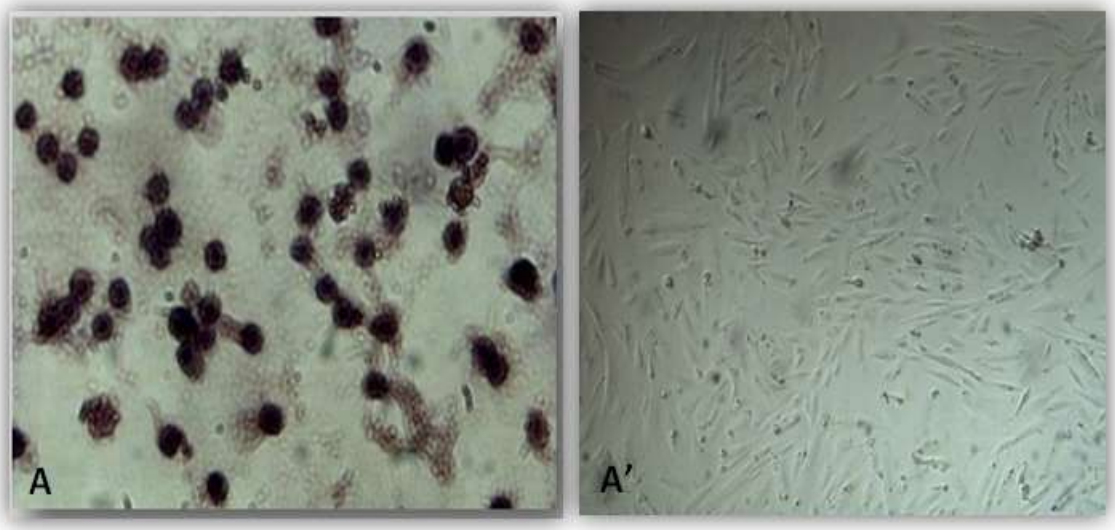
سلول‌های استرومای آندومتر به‌دلیل ماهیت فیبروبلاستی، ۳-۱ ساعت پس از جداسازی، به کف ظرف کشت چسبیده و با تعویض محیط کشت، سلول‌های احتمالی خونی و اپی‌تلیال نچسبیده به کف ظرف حذف شدند. آنها در روز اول کشت، کروی بوده و به‌تدریج پهن و فیبروبلاستی شدند. از روز نهم، اشکال چندوجهی و کنگره‌دار بزرگ تا روز ۱۵ کشت در گروه‌های کنترل مشاهده شد. با افزایش دوز دارو یا طولانی شدن مدت زمان کشت، میزان سلول‌های فیبروبلاستی چندوجهی کاهش یافته و سلول‌ها کروی مرده از کف ظرف کنده و شناور شدند.

در بررسی اثر داروی رالوکسیفن، کاهش چشمگیری در همپوشانی کف ظرف نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. این کاهش در گروه‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار نسبت به گروه کنترل بیشتر بود. همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها گفته شد، تغییرات ایجاد شده در سلول‌ها، نمره‌دهی شد و میانگین نمرات، به‌عنوان داده اصلی در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و تست توکی در مقایسه نمره تغییرات مورفولوژی فیبروبلاستی، در گروه‌های کنترل، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار دارو به‌ترتیب ۳/۹۸، ۳/۷۷، ۳/۷۲ و

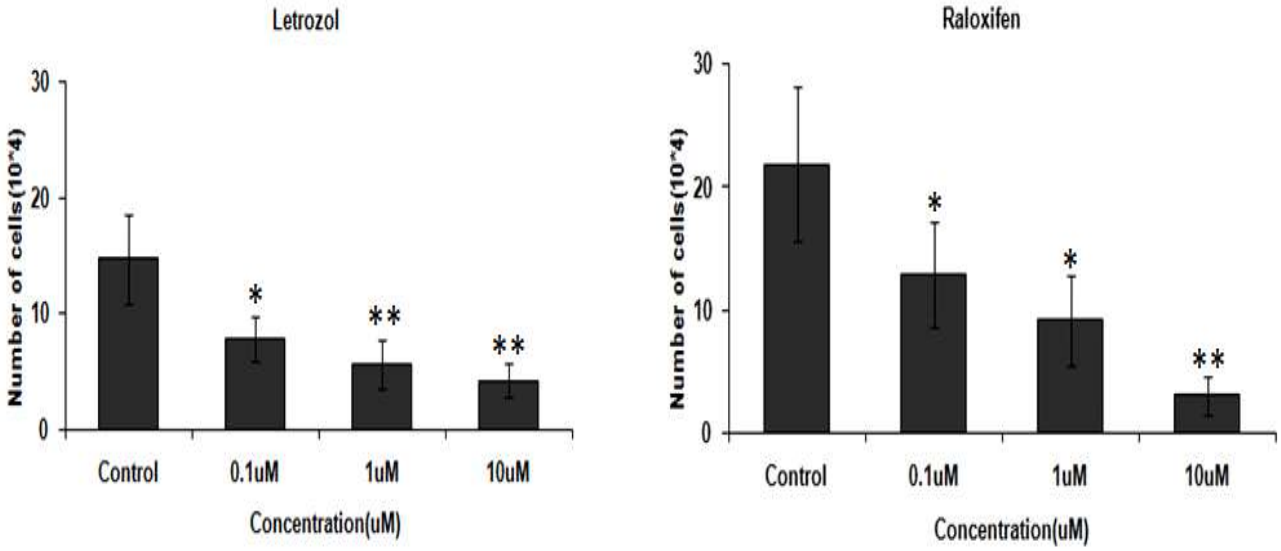
[1] Cluster of differentiation 31:CD31

۱/۱۸ بود و گروه ۱۰ میکرومولار نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

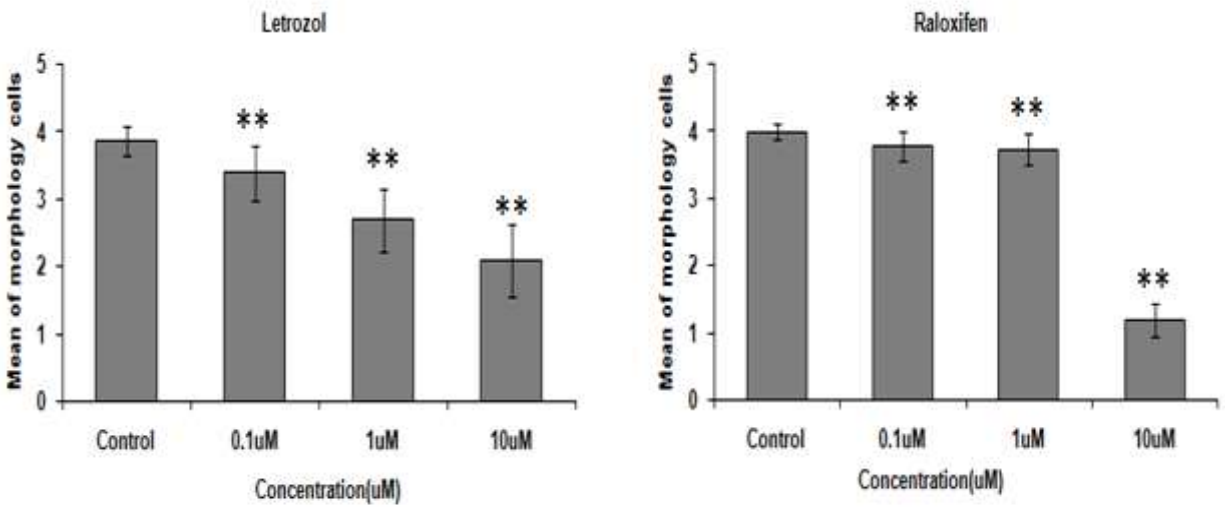
همچنین در بررسی اثر داروی لتروزول، تغییرات مورفولوژی فیبروبلاستی در گروه‌های کنترل، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار به‌ترتیب ۳/۸۶، ۳/۳۸، ۲/۶۸ و ۲/۰۸ بود و در هر سه گروه نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$) (شکل ۳). در مقایسه دو دارو، اثر دوزهای بالاتر خصوصاً دوز ۱۰ رالوکسیفن، شدیدتر بود.



شکل ۱- رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی آنتی‌ویمنتین برای شناسایی سلول‌های استروما (رنگ قهوه‌ای)، بزرگ‌نمایی 400X (A) مورفولوژی سلول‌های استرومایی پس از ۱۵ روز در محیط کشت بزرگ‌نمایی 200X (A')



شکل ۲- مقایسه تعداد سلول‌های استروما بین گروه‌های دارویی لتروزول و رالوکسیفن در مقایسه با گروه کنترل. اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل: آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و اختلاف معنی‌دار $p<۰/۰۰۱^{**}$، $p<۰/۰۵^{*}$



شکل ۳- مقایسه میانگین نمرات مورفولوژی سلول‌های استرومایی بین گروه‌های دارویی لتروزول و رالوکسیفن در مقایسه با گروه کنترل. آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و اختلاف معنی‌دار $p<۰/۰۰۱^{**}$، $p<۰/۰۵^{*}$

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه آثار داروهای لتروزول و رالوکسیفن بر سلول‌های استرومای آندومتر انسانی انجام شد و اثر دوزهای مختلف این داروها بر قابلیت زیست (تعداد) و مورفولوژی سلول‌ها بررسی گردید. میانگین تعداد سلول‌ها در گروه‌های دارویی رالوکسیفن و لتروزول نشان داد که داروی لتروزول و رالوکسیفن به‌طور معنی‌دار وابسته به دوز باعث کاهش تعداد سلول‌های استرومای آندومتر شدند. از طرفی مورفولوژی نرمال این سلول‌ها نیز به‌صورت وابسته به دوز این داروها، کاهش یافت. تأثیر داروی رالوکسیفن بر قابلیت زیست سلول‌ها نسبت به لتروزول شدیدتر بود، ولی لتروزول بر مورفولوژی تأثیر بیشتری داشت.

مورفولوژی سلول استروما به‌دلیل تمایز آن به سلول دسیدوا اهمیت دارد و با توجه به این‌که این سلول پس از لانه‌گزینی دچار تغییرات شدید می‌شود، بنابراین تخریب و تغییر ساختار سلول‌های استروما به‌وسیله رالوکسیفن باعث اختلال و عدم لانه‌گزینی مناسب و تغییر ساختار این سلول‌ها در تشکیل بخش مادری جفت می‌شود (۱، ۲۰).

اثرات ضدتکثیری رالوکسیفن بر سلول‌های استروما قبلاً گزارش شده است (۱۷). در مطالعه پُل و همکاران (۲۰۰۴) اثر رالوکسیفن بر سلول‌های استرومای آندومتری بررسی و مشخص شد که غلظت ۱۰ میکرومولار رالوکسیفن باعث کاهش قابل توجه قابلیت زیست و مورفولوژی نرمال سلول‌های استروما می‌شود که با مطالعه حاضر مطابقت داشت (۲۱). مطالعه گوان و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که رالوکسیفن به‌طور معنی‌داری آنزیم مهار کننده پلاسمینوژن که در تنظیم سیکل سلولی دخالت دارد را در آندومتر نرمال و بافت آندومتریوزی کاهش می‌دهد و این احتمال وجود دارد که کاهش رشد سلول‌های آندومتر توسط رالوکسیفن بتواند اثرات مثبتی بر درمان آندومتریوز داشته باشد (۲۲).

داویز و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که رالوکسیفن تکثیر آندومتر در زنان یائسه را مهار می‌کند (۲۳). در مطالعه دمیچل و همکاران (۲۰۰۸) نشان داده شد که رالوکسیفن باعث کاهش سرطان رحم می‌شود (۲۴) که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر از نظر مهار رشد و تکثیر سلول‌ها مطابقت داشت. از آنجایی که پلاسمینوژن عامل مهمی در تنظیم رشد و مرگ سلولی است و کاهش مهار کننده آن باعث مرگ سلولی و عدم تکثیر سلول می‌شود، اثر مهاری رالوکسیفن را بر تکثیر سلول توجیه می‌کند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر بر مورفولوژی سلول با مطالعه دمیچل و همکاران (۲۰۰۸)

مطابقت داشت و داروی رالوکسیفن باعث کاهش معنی‌دار مورفولوژی سلول‌های نرمال در دوز ۱۰ میکرومولار شد.

داروی لتروزول همانند رالوکسیفن باعث تغییر ساختار سلول‌های استرومای آندومتری در تشکیل بخش مادری جفت و اختلال و عدم لانه‌گزینی مناسب می‌شود. مصطفی قره‌باقی و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که لتروزول باعث کاهش تکثیر نامناسب آندومتر و هیپرپلازی ساده در زنان قبل و پس از یائسگی می‌شود (۲۵). همچنین بارکر و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که لتروزول باعث کاهش ضخامت آندومتر در بیماران هیپرپلازی و کارسینومای آندومتر می‌شود (۲۶). در مقابل، مطالعه سلیم و همکار (۲۰۱۲) نشان داد که لتروزول باعث بهبود جریان خون و پذیرندگی آندومتر و افزایش باروری در بیماران PCOS می‌شود (۲۷).

لتروزول علی‌رغم تأثیر مثبت بر القای تخمک‌گذاری و درمان ناباروری، باعث تغییر خصوصیات ساختاری سلول-های استروما نیز می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هر سه دوز ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار لتروزول خصوصیات مورفولوژیکی سلول‌های استروما را تغییر می‌دهد و تغییرات مورفولوژیکی آنها می‌تواند باعث کاهش سلول‌های دسیدوا و لانه‌گزینی نادرست، نارسایی جفت و ناباروری شود. البته شدت آن نسبت به داروی رالوکسیفن بیشتر بود. همچنین مالوف و همکاران (۲۰۰۱)، اثر مهاری لتروزول را بر سلول های استرومایی در سرطان آندومتر انسان گزارش و نشان دادند که لتروزول در کاهش این نوع سرطان‌ها در گریدهای پایین‌تر مؤثر است و باعث از بین رفتن این سلول‌ها می-شود (۲۸). فعالیت آنزیم آروماتاز P450 به‌عنوان آنزیم کلیدی در بیوسنتز استروژن و بروز ژن مربوط به آنزیم آروماتاز در بافت‌های آندومتریوزی ثابت شده است (۲۹). ارتباط بین اثر تحریکی استروژن بر رشد بافت و سلول-های آندومتر از یک سو و اثرات مهاری لتروزول بر بیوسنتز استروژن از سوی دیگر نشان داد که این احتمال وجود دارد که لتروزول در محیط کشت، بیوسنتز استروژن را مهار کرده و باعث کاهش رشد سلول‌های استروما شود (۳۰) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت و اثر ضد تکثیری لتروزول به‌صورت وابسته به دوز را نشان می‌دهد. هرچند در مطالعه خزاعی و همکاران (۲۰۰۹) اثرات تحریکی برخی دوزهای آن بر بافت آندومتر نرمال کشت شده در شرایط سه‌بُعدی در زمینه فیبرینی گزارش شده است (۲۹).

کشت سلول‌های آندومتریوزی و اثر داروی لتروزول (دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ نانومولار) و تعیین درصد سلول‌های آپوپتوزی در محیط کشت نشان داده شده است. این دارو باعث افزایش درصد سلول‌های آپوپتوزی در محیط کشت می‌شود. در مطالعه حاضر مسیر آپوپتوزی به‌صورت وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز دارو از ۱ به ۱۰۰ نانومولار، مکانیسم‌های مرگ سلولی افزایش یافته است (۳۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان مرگ سلولی در غلظت ۱ و ۱۰ میکرومولار به‌طور وابسته به دوز افزایش می‌یابد، با این حال، مطالعه تأثیر لتروزول بر رشد سلول‌های اپی‌تلیال در شرایط آزمایشگاهی و القای مرگ سلولی در سایر سلول‌های آندومتر ضروری است. مشابه مطالعه حاضر، گاروتی و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که لتروزول (یک مهار کننده آروماتاز) باعث کاهش ضخامت آندومتر و به‌دنبال آن کاهش هیپرپلازی آندومتر و آدنوسارکوم می‌شود (۳۲).

آنچه مسلم است لتروزول با مهار بیوسنتز استروژن در سلول‌هایی که رشد آنها وابسته به استروژن است، اثر مهاری ایجاد کرده و در درمان سرطان‌های ناشی از این سلول‌ها مؤثر است. اثرات مهاری لتروزول بر رشد رده‌های سلول‌های سرطانی پستان در محیط کشت نشان داد که لتروزول رشد سلول‌های سرطانی شرایط کشت دوبُعدی و سه‌بُعدی را مهار می‌کند (۳۳).

در مطالعه حاضر اثرات مهاری داروی لتروزول در کشت سلول‌های استرومای آندومتر به اثبات رسید که مشابه اثرات مهاری آن بر سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد و ممکن است مکانیسم‌های تأثیر این دارو به‌عنوان مهار کننده آروماتاز خصوصاً در مورد سلول‌هایی که گیرنده‌های استروژنی مثبت دارند، یکسان باشد، ولی برای بررسی بیومولکولی مهار رشد سلول‌ها، مطالعات بیشتری ضرورت دارد. به‌طور کلی داروی رالوکسیفن و لتروزول به‌عنوان داروهای ضداستروژنی استفاده

می‌شوند. تأثیر آنها بر تعداد، مورفولوژی و تغییرات ساختاری سلول‌های استروما تأیید شده است. همچنین از این داروها می‌توان برای درمان آندومتریوزی استفاده کرد، هرچند بر اساس مطالعه حاضر رالوکسیفن مناسب‌تر به‌نظر می‌رسد، اما جهت بررسی آثار رالوکسیفن و لتروزول، مطالعات بیشتری خصوصاً در مدل‌های کشت سه‌بُعدی نیاز است.

نتیجه‌گیری

اثر نامطلوب رالوکسیفن بر سلول‌های استرومای آندومتر در دوزهای بالاتر، بیشتر است و همچنین مورفولوژی نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. داروی لتروزول نیز باعث ایجاد مرگ سلولی و مهار رشد و تکثیر سلول‌های استروما می‌شود و تغییرات مورفولوژیکی را با شدت بیشتری ایجاد می‌کند، بنابراین از این دو دارو باید به‌صورت کنترل شده استفاده کرد و از داروی رالوکسیفن در دوزهای خیلی پایین استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2018.
2. Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. Human reproduction 2001; 16(5):836-45.
3. Danforth DN. Danforth's obstetrics and gynecology: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
4. Talebi Tamajani Z, Mohammadi SD, Gorji M, Alimoradi Z. Comparison of the efficacy of Letrozole versus Clomiphene Citrate among Iranian infertile females: A systematic review and meta-analysis. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility 2019; 22(7):89-102.
5. Haynes B, Dowsett M, Miller W, Dixon J, Bhatnagar A. The pharmacology of letrozole. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 2003; 87(1):35-45.
6. Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, Bulun SE. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. Fertility and sterility 2004; 81(2):290.٦-
7. Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. Fertility and sterility 2001; 75(2):305-9.
8. Scott J, Da CC, Early J. Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator. American family physician 1999; 60(4):1131-9.
9. Lam PM, Yim SF, Briton-Jones C, Chung TKH, Haines C. Raloxifene therapy in postmenopausal women is associated with a significant reduction in the concentration of serum vascular endothelial growth factor. Fertility and sterility 2004; 81(2):393-7.
10. Kalidas M, Hilsenbeck S, Brown P. Defining the role of raloxifene for the prevention of breast cancer. Oxford University Press; 2004.
11. Palomba S, Orio Jr F, Morelli M, Russo T, Pellicano M, Zupi E, et al. Raloxifene administration in premenopausal women with uterine leiomyomas: a pilot study. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2002; 87(8):3603-8.
12. Jeong EJ, Liu Y, Lin H, Hu M. Species-and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. Drug metabolism and disposition 2005; 33(6):785-94.
13. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. JAMA 1999; 281(23):2189-97.
14. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. Molecular medicine reports 2015; 11(3):1566-72.
15. Bläuer M, Heinonen PK, Rovio P, Ylikomi T. Effects of tamoxifen and raloxifene on normal human endometrial cells in an organotypic in vitro model. Eur J Pharmacol 2008; 592(1-3):13-8.
16. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev 1994; 15(3):342-55.
17. Yanaihara A, Otsuka Y, Iwasaki S, Aida T, Tachikawa T, Irie T, et al. Differences in gene expression in the proliferative human endometrium. Fertil Steril 2005; 83(4):1206-15.
18. Khazaei M, Roshankhah S, Ghorbani R, Chobsaz F. Sildenafil effect on nitric oxide secretion by normal human endometrial epithelial cells cultured in vitro. Int J Fertil Steril 2011; 5(3):142-7.
19. Esfandiari N, Khazaei M, Ai J, Nazemian Z, Jolly A, Casper RF. Angiogenesis following three-dimensional culture of isolated human endometrial stromal cells. Int J Fertil Steril 2008; 2(1):19-22.
20. TW S. Langman's Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia Pennsylvania USA; 2011.

21. Pole J, Carmichael P, Griffin J. Identification of transcriptional biomarkers induced by SERMS in human endometrial cells using multivariate analysis of DNA microarrays. Biomarkers 2004; 9(6):447-60.
22. Guan YM, Carlberg M, Bruse C, Carlstrom K, Bergqvist A. Effects of hormones on uPA, PAI-1 and suPAR from cultured endometrial and ovarian endometriotic stromal cells. Acta Obstet Gynecol Scand 2002; 81(5):389-97.
23. Davies GC, Huster WJ, Shen W, Mitlak B, Plouffe L Jr, Shah A, et al. Endometrial response to raloxifene compared with placebo, cyclical hormone replacement therapy, and unopposed estrogen in postmenopausal women. Menopause 1999; 6(3):188-95.
24. DeMichele A, Troxel AB ,Berlin JA, Weber AL, Bunin GR, Turzo E, et al. Impact of raloxifene or tamoxifen use on endometrial cancer risk: a population-based case-control study. J Clin Oncol 2008; 26(25):4151-9.
25. Mostafa Gharabaghi P, Azadi A, Dastranj Tabrizi A, Ouladsahebmadarek E, Tasbihi P, Shoari N. Effect of letrozole on endometrial histology in patients with disordered proliferative endometrium and simple hyperplasia. Int J Women's Health Reproduction Sci 2014; 2(2):73-79.
26. Barker LC, Brand IR, Crawford SM. Sustained effect of the aromatase inhibitors anastrozole and letrozole on endometrial thickness in patients with endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. Curr Med Res Opin 2009; 25(5):1105-9.
27. Selim MF, Borg TF. Letrozole and clomiphene citrate effect on endometrial and subendometrial vascularity in treating infertility in women with polycystic ovary syndrome. Journal of Gynecologic Surgery 2012; 28(6):405-10..
28. Maluf FC, Sabbatini P, Schwartz L, Xia J, Aghajanian C. Endometrial stromal sarcoma: objective response to letrozole. Gynecologic oncology. 2001;82(2):384-8.
29. Khazaei M, Montaseri A, Casper RF. Letrozole stimulates the growth of human endometrial explants cultured in three-dimensional fibrin matrix. Fertil Steril 2009; 91(5 Suppl):2172-6.
30. Fang Z, Yang S, Gurates B, Tamura M, Simpson E, Evans D, et al. Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(7):3460-6.
31. Meresman GF, Bilotas M, Abello V, Buquet R, Tesone M, Sueldo C. Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. Fertil Steril 2005; 84(2):459-63.
32. Garuti G, Cellani F, Centinaio G, Montanari G, Nalli G, Luerti M. Prospective endometrial assessment of breast cancer patients treated with third generation aromatase inhibitors. Gynecol Oncol 2006; 103(2):599-603.
33. Kijima I, Itoh T, Chen S. Growth inhibition of estrogen receptor-positive and aromatase-positive human breast cancer cells in monolayer and spheroid cultures by letrozole, anastrozole, and tamoxifen. J Steroid Biochem Mol Biol 2005; 97(4):360-8.