Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

The effect of resveratrol on the migration and proliferation ability of stem cells derived from menstrual blood of women with endometriosis

Hoda Fazaeli PhD student, Department of Biology, Faculty of Convergent Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. hodafazaely@yahoo.com

Nasim Hayati Roodbari Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Convergent Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran **(Corresponding author).** hayati@srbiau.ac.ir.

Ehsan Ehsani Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Rudhen Branch, Islamic Azad University, Rudhen, Iran. e.ehsani@iau.ac.ir

Azar Sheikholeslami Assistant Professor, Department of Mesenchymal Stem Cells, Academic Jahad, Qom Branch, Qom, Iran. sheikholeslami@acecr.ac.ir

Abstract

Objective: 10% of women of reproductive age experience endometriosis as an inflammatory and hormone-dependent disease. Due to the failure of current treatment approaches, it is necessary to use new and alternative drugs to improve endometriosis treatments. Resveratrol has received much attention due to its many biological effects such as antineoplastic, antioxidant, anti-angiogenic, anti-proliferative, anti-inflammatory and pro-apoptotic properties. The gene expression profile of menstrual blood-derived stem cells (MenSCs) of endometriotic and non-endometriotic women is different. Therefore, in the present study, an attempt was made to evaluate the effects of resveratrol on cell migration and the expression levels of VEGF, KRAS, and IDO1 genes as factors related to cell proliferation in MenSCs of patients with endometriosis.

Materials and methods: MenSCs from healthy women (NE-MenSCs) and endometriosis (E-MenSCs) were isolated and cultured in the laboratory using Faycol solution. E-MenSCs were treated with 100 µM resveratrol for 72 hours, while in NE-MenSCs and E-MenSCs groups, the cells did not receive any treatment during this period. Investigating the ability of migration and expression level of genes was done using scratch test and real-time PCR.

Findings: After 36 hours, in both NE-MenSCs and Resveratrol groups, the scratch closure percentage was significantly lower than the E-MenSCs group. Also, the expression of KRAS and VEGF genes in the Resveratrol group was significantly lower than the E-MenSCs group.

Conclusion: Resveratrol can reduce the progression of endometriosis by reducing the ability of cells to migrate and reducing the expression of VEGF and KRAS.

Keywords: endometriosis, resveratrol, stem cells, menstrual blood, women.

Received: 2023/10/07 ; **Revised:** 2023/10/24 ; **Accepted:** 2023/12/09 ; **Published online:** 2023/12/26

Cite: Fazaeli, H., Hayati Roodbari, N., Ehsani, E. & Sheikholeslami, A. (2023). The effect of resveratrol on the migration and proliferation ability of stem cells derived from menstrual blood of women with endometriosis. *Applied Biology*, 13(3), p. 37-54.

Article type: Research Article © the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

تأثیر رزوراترول بر توانایی مهاجرت و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی زنان مبتلا به اندومتریوز

هدی فضائلی دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. hodafazaely@yahoo.com
نسیم حیاتی رودباری دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (**نویسنده مسئول**). hayati@srbiau.ac.ir
احسان احسانی استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران. e.ehsani@iau.ac.ir
آذر شیخ‌الاسلامی استادیار، گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جهاد دانشگاهی، واحد قم، قم، ایران. sheikholeslami@acecr.ac.ir

چکیده

هدف: ۱۰ درصد از زنان در سنین باروری اندومتریوز را به عنوان یک بیماری التهابی و وابسته به هورمون تجربه می‌کنند. به دلیل نارسایی رویکردهای درمانی فعلی، استفاده از داروهای جدید و جایگزین برای بهبود درمان‌های اندومتریوز ضروری است. رزوراترول به دلیل اثرات بیولوژیکی متعددی مانند خواص آنتی نئوپلاستیک، آنتی اکسیدانی، ضد رگ‌زایی، ضد تکثیری، ضد التهابی و پیش آپوپتوزی، مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. پروفایل بیان ژن سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی (MenSCs) زنان اندومتریوزی و غیراندومتریوزی متفاوت است. بنابراین، در پژوهش حاضر تلاش شد که اثرات رزوراترول بر مهاجرت سلولی و میزان بیان ژن‌های VEGF، KRAS و IDO1 - به عنوان عوامل مرتبط با تکثیر سلولی- در MenSCs بیماران مبتلا به اندومتریوز ارزیابی شوند.

مواد و روش‌ها: با استفاده از محلول فایکول، MenSCs زنان سالم (NE-MenSCs) و مبتلا به اندومتریوز (E-MenSCs) جدا شده و در آزمایشگاه کشت داده شدند. E-MenSCs با 100 µM رزوراترول به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند، در حالی‌که در گروه‌های NE-MenSCs و E-MenSCs، سلول‌ها طی این مدت هیچ درمانی دریافت نکردند. بررسی توانایی مهاجرت و سطح بیان ژن‌ها، با استفاده از آزمون خراش و Real-time PCR انجام شد.

پژوهش حاضر برگرفته از: رساله دکتری هدی فضائلی، با عنوان «**بررسی مقایسه‌ای تاثیر microRNA و داروی گیاهی Resveratrol بر بهبود الگوی بیان ژنی و عملکردی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی زنان مبتلا به اندومتریوز**»، ارائه شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران است.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۵ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۸/۰۲ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۹/۱۸ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

استناد به این مقاله: فضائلی، هدی؛ حیاتی رودباری، نسیم؛ احسانی، احسان؛ شیخ‌الاسلامی، آذر (۱۴۰۲). تأثیر رزوراترول بر توانایی مهاجرت و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی زنان مبتلا به اندومتریوز. *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۳)، ص ۳۷-۵۴.

ناشر: دانشگاه قم **© نویسندگان** **نوع مقاله: پژوهشی**

CC BY NC

یافته‌ها: پس از ۳۶ ساعت، در هر دو گروه NE-MenSCs و Resveratrol درصد بسته شدن خراش به طور معنی‌داری کمتر از گروه E-MenSCs بود. همچنین بیان ژن‌های KRAS و VEGF در گروه Resveratrol به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه E-MenSCs بود.

نتیجه‌گیری: رزوراترول می‌تواند پیشرفت اندومتریوز را از طریق کاهش توانایی مهاجرت سلول‌ها و کاهش بیان VEGF و KRAS کاهش دهد.

کلیدواژه‌ها: اندومتریوز، رزوراترول، سلول‌های بنیادی، خون قاعدگی، زنان.

۱. مقدمه

اندومتر انسان بافتی منحصربه‌فرد با نقشی محوری در باروری زنان است که در طول دوره قاعدگی تحت تکثیر، رشد، رگزایی، بازآرایی و ریزش گسترده قرار می‌گیرد (۱). اندومتریوز[1] به عنوان یک اختلال تکثیری مزمن وابسته به استروژن تعریف می‌شود که با حضور بافت اندومتر (غدد و استروما) به صورت نابجا (خارج از رحم) مشخص می‌گردد (۲). اندومتریوز، ۱۰ درصد از زنان در سنین باروری را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳) و تظاهراتی شامل دردهای شدید لگنی، دیسمنوره[2]، دیسپارونی[3] و ناباروری دارد که بر کیفیت زندگی در جنبه‌های مختلف آن - شغلی، اجتماعی، جنسی و غیره تأثیر منفی می‌گذارد (۴). علاوه‌بر این، برخی از مطالعات گزارش کرده‌اند که اندومتریوز ارتباط نزدیکی با افزایش میزان بروز تومورهای بدخیم اندومتر و تخمدان دارد و ممکن است پیش‌زمینه‌ای برای سرطان تخمدان اپیتلیال باشد و یا اثر تحریک‌کننده توموری در سرطان تخمدان داشته باشد (۵). چندین فرضیه در خصوص پاتوژنز اندومتریوز ارائه شده است: قاعدگی رتروگرید، انتشار لنفاوی و هماتوژن، متاپلازی صفاقی، فعال شدن باقیمانده‌های مولر، ایمنی سلولی و فرضیه سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز (۶-۸).

هیچ یک از این تئوری‌ها به تنهایی مکانیسم و ویژگی‌های مختلف بیولوژیکی و بالینی اندومتریوز را توضیح نمی‌دهند. با این حال، یک نظریه غالب ارائه شده توسط سامپسون نشان می‌دهد که در طول فاز قاعدگی، قطعات بافت اندومتر راه بازگشت خود را از طریق لوله‌های فالوپ به حفره صفاقی یافته و در آنجا ایمپلنت شده و ضایعه ایجاد می‌کنند (۹). البته باید توجه داشت که جریان رتروگرید قطعات اندومتر در اکثر زنان به عنوان یک پدیده فیزیولوژیکی رخ می‌دهد، در حالی‌که اندومتریوز تنها در ۱۰% از این زنان رخ می‌دهد (۱۰). این امر می‌تواند نشان‌دهنده دخالت عواملی دیگر در ایجاد اندومتریوز باشد. بنابر نظریه سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی اندومتر در پاتوژنز اندومتریوز نقش دارند. شواهدی وجود دارد که حضور سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز در بافت‌های اندومتر به جا[4] و ضایعات اندومتریوز نابجا[5] را تأیید می‌کند (۱۱-۱۳). با توجه به تئوری‌های قاعدگی رتروگرید و سلول‌های بنیادی، به نظر می‌رسد که خون قاعدگی منبع کلیدی سلول‌های بنیادی استرومایی بوده که ممکن است رابط بین ضایعات اندومتر و اندومتریوز باشند. در واقع، خون قاعدگی حاوی جمعیت

1. Endometriosis
2. Dysmenorrhea
3. Dyspareunia
4. Eutopic
5. Ectopic

ناهمگنی از سلول‌ها، ازجمله سلول‌های بنیادی اندومتر، با ظرفیت ترمیمی است (۱۴،۱۵). این سلول‌های بنیادی بازسازی‌کننده اندومتر دارای چندین ویژگی فنوتیپی و عملکردی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی[1] (MSCs) هستند (۱۶)؛ زیرا در حالی‌که CD29، CD44، CD73، CD90 و CD105 را بیان می‌کنند، برای مارکرهای هماتوپوئتیک و اندوتلیالی منفی بوده و قادر به تمایز به دودمان‌های سلولی مختلف هستند (۱۴، ۱۷-۱۹). به این ترتیب ماهیت ذاتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی[2] (MenSCs) نیز می‌تواند نقش کلیدی در بروز بیماری داشته باشد. در پژوهشی بیان افتراقی برخی از ژن‌های دخیل در چندین پروسه سلولی مهم از قبیل التهاب، آپوپتوز، مهاجرت و رگ‌زایی در MenSCs زنان مبتلابه اندومتریوز و زنان سالم نشان داده شده است (۲۰). بنابراین، به نظر می‌رسد تعدیل الگوی بیان ژن در MenSCs زنان مبتلا به اندومتریوز (E-MenSC) می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی در نظر گرفته شود.

در حال حاضر، درمان دارویی و جراحی رزکسیون، رویکردهای اصلی درمانی برای اندومتریوز هستند. دارو درمانی عمدتاً شامل درمان هورمونی -که باعث ایجاد هیپواستروژنیسم می‌شود- و درمان غیرهورمونی -به منظور کاهش درد ناشی از اندومتریوز- است (۲۱). با این حال، اثربخشی داروهای معمولی در اکثر بیماران محدود یا ناپیوسته است؛ زیرا استفاده طولانی مدت از این داروها علائم پیش از یائسگی، خونریزی پیش‌رونده و پوکی استخوان به دلیل وضعیت هیپواستروژنیک و همچنین سایر عوارض جانبی مانند ترومبوز، و آسیب عملکرد کبد را درپی خواهد داشت (۲۱، ۲۲). به‌علاوه، باوجودی که هدف از جراحی، تخریب یا حذف ضایعات نابجای قابل مشاهده، بازگرداندن آناتومی طبیعی، کاهش درد و بهبود ناباروری است، اما میزان عود اندومتریوز پس از جراحی نسبتاً بالا است (۲۳). جراحی همراه با درمان هورمونی، خطر عود بیماری را کاهش می‌دهد، اما درمان هورمونی رشد فولیکولی و تخمک‌گذاری را مهار می‌کند، که در برخی از بیماران با نیازهای تولیدمثلی مغایر است (۲۴).

با توجه به محدودیت‌های استراتژی‌های درمانی موجود، استفاده از داروهای مکمّل و جایگزین جدید برای بهبود درمان‌های اندومتریوز، ضروری به نظر می‌رسد. در چند دهه گذشته، ترکیبات طبیعی که عمدتاً از گیاهان به دست می‌آیند، به طور فزاینده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲۵). ترکیبات طبیعی دارای مزایای بالقوه‌ای نسبت به داروهای مصنوعی هستند که از طریق سنجش‌های

1. Mesenchymal Stem Cells
2. Menstrual-derived Stem Cells

مبتنی بر هدف از نظر تحمل، عوارض جانبی و مقرون به صرفه بودن ساخته می‌شوند و بدین ترتیب نویدبخش گزینه‌های درمانی جدیدی برای اندومتریوز هستند.

رزوراترول یک پلی فنول طبیعی با خواص ضد تکثیری، پروآپوپتوتیک، ضد رگ‌زایی، آنتی اکسیدانی، ضد تهاجمی و ضد چسبندگی است که عمدتاً در انگور و شراب قرمز یافت می‌شود (۲۶). با توجه به شواهد موجود مبنی بر اینکه رزوراترول دارای اثراتی بالقوه و قابل توجه در اندومتریوز است، به نظر می‌رسد که می‌تواند به عنوان یک داروی مکمّل و کمکی جدید برای درمان اندومتریوز در نظر گرفته شود. با این حال، مکانیسم‌های دقیق تعامل رزوراترول با سلول‌های اندومتر هنوز ناشناخته است. بنابراین، مطالعات بیشتر برای ارزیابی اثرات رزوراترول بر بافت‌های اندومتر بیماران مبتلا به اندومتریوز، ضروری است. در مطالعه حاضر تلاش شد اثرات رزوراترول بر مهاجرت سلولی و میزان بیان ژن‌های VEGF، KRAS و IDO1 -به عنوان عوامل مرتبط با مهاجرت و تکثیر سلولی- در MenSCs بیماران اندومتریوز بررسی شود.

۲. مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بر روی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی زنان مبتلا به اندومتریوز و مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم انجام گرفت و تاثیر رزوراترول بر روی میزان بیان ژن‌های VEGF، KRAS و IDO1 و مهاجرت این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۱. جداسازی و کشت سلول

از آنجا که به منظور مقایسه پارامترهای مورد مطالعه، بایستی جداسازی سلول‌های MenSC هم از زنان سالم و هم از زنان مبتلا به اندومتریوز صورت بگیرد، خون قاعدگی از هر دو گروه جمع‌آوری شد. وجود بیماری اندومتریوز با گرید ۳ و ۴ توسط پزشک متخصص و با بررسی علائمی همچون سیکل قاعدگی نامنظم، درد لگن و ناباروری، به روش لاپاروسکوپی محرز گردید. به‌طور خلاصه، ۲ میلی‌لیتر خون قاعدگی با استفاده از یک پایپل سرنگی (Endometrial-suction-curette, Tasnim gostar, Iran) استریل در روز دوم یا سوم سیکل قاعدگی و پس از أخذ رضایت‌نامه آگاهانه از زنان سالم (زنانی که با مشکل ناباروری مردانه[1] مراجعه کردند) و زنان مبتلا به اندومتریوز جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه کشت سلول انتقال داده شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای به روش گرادیان غلظت با استفاده از محلول فایکول و براساس پروتکل ارائه شده توسط صحرایی و همکاران جدا شدند (۲۷). این سلول‌ها پس از

1. Male factor

جداسازی داخل ظرف کشت حاوی محیط کشت سلول‌های بنیادی بالغ[1] با ترکیب ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی[2] و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند و تحت شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵% در دستگاه انکوباتور قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها شستشو داده شدند تا محیط کشت حاوی سلول‌های غیرچسبنده حذف گردد. هر ۴-۳ روز یک بار، تعویض محیط سلول‌ها با محیط کشت تازه انجام شد. در تراکم سلولی ۸۰-۷۰%، MenSCs با استفاده از آنزیم ترپیسین از کف ظرف کشت جدا شده و پس از آنکه تعداد، قابلیت زنده‌مانی و خلوص آنها توسط ترپیان بلو[3] و هموسایتومتر ارزیابی شد، مجدداً کشت داده شدند. در نهایت سلول‌ها در پاساژ ۳ مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲. تائید هویت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی

به منظور بررسی ماهیت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، درصد بیان تعدادی از آنتی‌ژن‌های سطحی اختصاصی این سلول‌ها از قبیل CD105، CD73 و CD90 با استفاده از روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. همچنین به منظور بررسی عدم آلودگی به سلول‌های هماتوپویتیک، بیان مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها ازجمله CD45 و CD34 نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۳. تیمار سلول‌ها

سلول‌ها با رسیدن به پاساژ ۳ در پلیت‌های ۱۵×۶۰ میلی‌متر مربع کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم ۷۰%، سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در گروه‌های مختلف آزمایشی که عبارت بودند از: گروه NE-MenSCs (سلول‌های MenSC جدا شده از زنان سالم که تیماری دریافت نکردند)، گروه E-MenSCs (سلول‌های MenSC جدا شده از زنان مبتلا به اندومتریوز که تیماری دریافت نکردند) و گروه Resveratrol (سلول‌های MenSC جدا شده از زنان مبتلا به اندومتریوز که 100 µM داروی رزوراترول به محیط کشت آنها به عنوان تیمار افزوده شد (۲۸))، کشت داده شدند.

۲-٤. ارزیابی مهاجرت سلولی و تکثیر با استفاده از تست خراش[4]

از روش خراش برای ارزیابی ظرفیت مهاجرت سلولی در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد.

---

1. DMEM
2. Fetal Bovine Serum
3. Invitrogen, USA
4. Scratch Assay

سلول‌های هر گروه در ۳ چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای (۲×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک) کشت داده شدند، تا به تراکم کامل رسیدند. یک خراش روی تک لایه سلولی در مرکز هر چاهک با استفاده از سرسمپلر زرد (۱۰۰ µL) ایجاد شد و سلول‌ها از آن ناحیه جدا شدند. سپس چاهک‌ها با استفاده از بافر PBS چند بار شستشو داده شدند، تا سلول‌های کنده شده از چاهک خارج شوند. در نتیجه، یک منطقه عاری از سلول برای تحریک سلول‌ها به حرکت و بستن شکاف تشکیل شد. در نهایت به هر چاهک حدود ۵۰۰ µL محیط کشت DMEM حاوی ۲ درصد FBS اضافه شده و پلیت به داخل انکوباتور منتقل گردید. سپس عکسبرداری از ناحیه خراش در فواصل منظم ۰، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت انجام شد. سطح ناحیه خراش در تصاویر بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار ImageJ تعیین شد و نرخ مهاجرت به عنوان درصد کاهش سطح یا بسته شدن زخم در سه نمونه مستقل در هر گروه با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد بسته شدن خراش در زمان مورد نظر} = \frac{\text{سطح خراش در زمان مورد نظر بعد از ایجاد خراش} - \text{سطح خراش در ابتدای ایجاد خراش}}{\text{سطح خراش در ابتدای ایجاد خراش}} \times 100$$

۲-۵. بررسی سطح بیان ژن به روش Real-time PCR

تست Real Time PCR ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها برای اندازه‌گیری سطح بیان ۳ ژن VEGF، IDO1 و KRAS انجام شد.

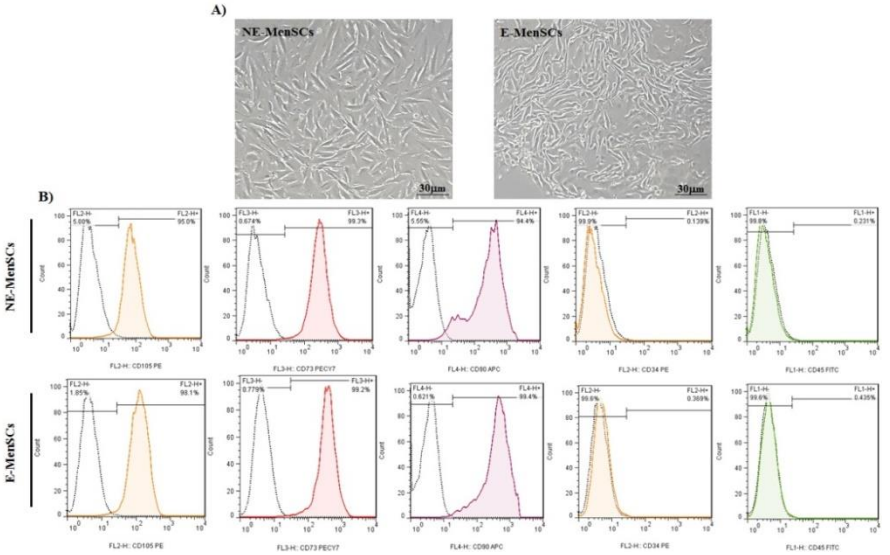
به‌طور خلاصه، پس از تریپسینه کردن سلول‌ها در هر گروه، RNA تام آنها با استفاده از کیت RNeasy (Gene All Biotechnology, Seoul, Korea) و طبق پروتکل استخراج شد و از اسپکتروفتومتر نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) برای ارزیابی خلوص و کمّیت RNA در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. با استفاده از کیت رونویسی (یکتا تجهیز، ایران)، cDNA تک‌رشته‌ای از طریق رونویسی معکوس سنتز شد. بیان ژن‌های هدف با استفاده از روش Syber Green و با کمک دستگاه ABi Plus one (Applied Biosystems, USA) مورد بررسی قرار گرفت. ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن خانه‌دار و به منظور نرمالایز کردن میزان کل RNA موجود در هر واکنش استفاده شد. از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای بررسی سطوح بیان نسبی ژن‌ها در گروه‌های سالم، بیمار و رزوراترول، استفاده گردید. هر آزمون سه مرتبه تکرار شد. توالی پرایمر ژن‌های مورد بررسی در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های مورد مطالعه

نام ژن	شماره بانک ژنی	پرایمر	توالی ('۳-'۵)	اندازه محصول (جفت باز)
VEGF	NM_001171622.2	F	TGCTTGCCATTCCCCACTT	195
		R	ACTTTGCCCCTGTCGCTTT	
IDO1	NM_002164.6	F	TCCTTACTGCCAACTCTCCA	116
		R	TGTTCTCATAAGTCAGGGGC	
KRAS	NM_033360.4	F	GAGTGCCTTGACGATACAGC	142
		R	CTCCTCTTGACCTGCTGTGT	

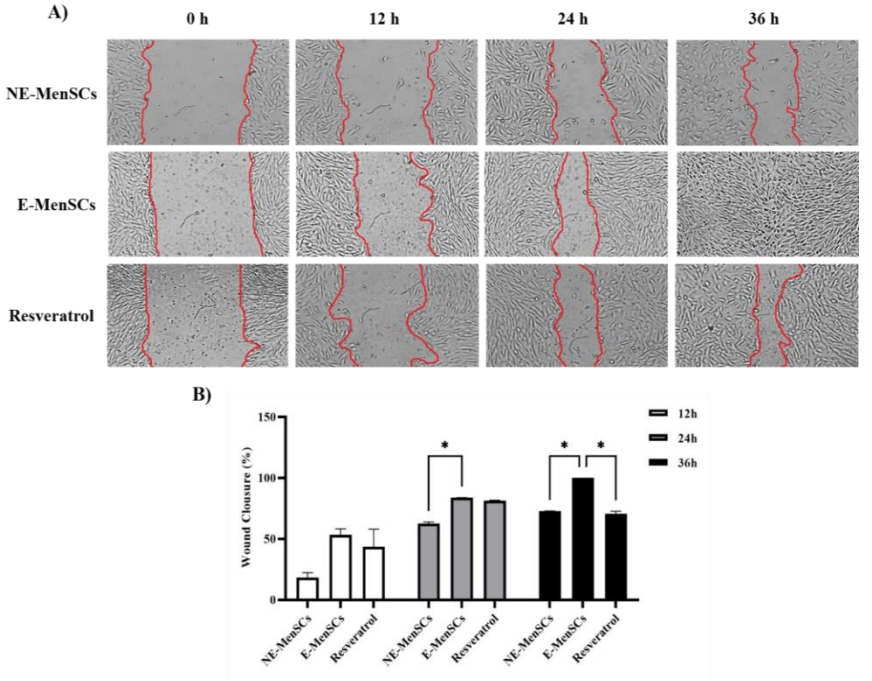
۳. نتایج

در طول کشت اولیه، E-MenSCs جدا شده به لحاظ مورفولوژیک از کشیدگی کمتری نسبت به حالت دوکی شکل و فیبروبلاست مانند NE-MenSCs برخوردار بودند. MenSCs به طور کلی ویژگی‌های رشدی معمول سلول‌های بنیادی استرومایی را نشان دادند (مورفولوژی دوکی شکل و فیبروبلاست مانند با الگوی رشد شعاعی یا مارپیچ). نتایج تست فلوسایتومتری MenSCs در پاساژ ۳ نشان داد که بیان CD73، CD90 و CD105 برای هر دو رده NE-MenSCs و E-MenSCs مثبت و بیان CD45 و CD34 منفی بود (شکل ۱).



شکل ۱- خصوصیت‌یابی سلول‌های MenSC. A) تصویر میکروسکوپ اینورت از کشت اولیه سلول‌های NE-MenSC و E-MenSC که مورفولوژی کشیده‌تر سلول‌های NE-MenSC را نسبت به سلول‌های E-MenSC نشان می‌دهد. B) بررسی فلوسایتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های NE-MenSC و E-MenSC که نشان از بیان مثبت مارکرهای مزانشیمی CD105، CD73 و CD90 و بیان منفی مارکرهای هماتوپوئتیک CD34 و CD45 دارد.

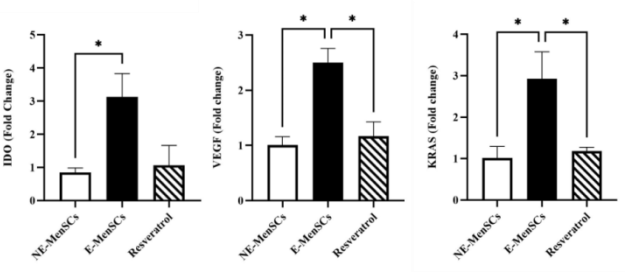
همانطور که در شکل (۲A) مشاهده می‌شود، در گروه‌های مختلف میزان بسته شدن خراش به طور متفاوتی اتفاق افتاد. ۱۲ ساعت پس از ایجاد خراش، ظرفیت مهاجرتی سلول‌ها در گروه‌های مطالعه، تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0.05$). در نقطه زمانی ۲۴ ساعت، میزان بسته شدن خراش در گروه NE-MenSCs از نظر آماری نسبت به گروه E-MenSCs کمتر بود (p=۰/۰۴۶۴)، در حالی که پس از ۳۶ ساعت، در هر دو گروه NE-MenSCs و Resveratrol درصد بسته شدن خراش به طور معنی‌داری کمتر از گروه E-MenSCs بود (به ترتیب p=۰/۰۲۱۱ و p=۰/۰۴۷) (شکل ۲B).



شکل ۲- بررسی میزان مهاجرت سلولی ۱۲، ۲٤ و ۳٦ ساعت پس از ایجاد خراش (ساعت ۰). A) عکس میکروسکوپی از بسته شدن محل خراش با استفاده از عدسی×40. B) مقایسه آماری درصد بسته شدن خراش در گروه‌های مختلف و زمان‌های ۱۲، ۲٤و ۳٦ ساعت پس از ایجاد خراش، p≤0.05*

براساس نتایج حاصل از تست Real-Time PCR، میزان بیان هر سه ژن IDO1، VEGF و KRAS در گروه E-MenSCs نسبت به گروه NE-MenSCs به طور معنی‌داری دچار فراتنظیمی شده بود (به ترتیب p=۰/۰۴۹۹، p=۰/۰۱۴۶ و p=۰/۰۳۸۶). با این وجود، اگرچه در مقایسه با گروه سلول‌های بیمار (E-MenSCs) در گروه Resveratrol کاهش بیان ژن IDO1 مشاهده نشد (p=۰/۰۶۴۲)، سطح بیان ژن‌های VEGF و KRAS پس از تیمار سلول‌های E-MenSC با

Resveratrol به طور معنی‌داری کاهش یافت (به ترتیب p=۰/۰۲ و p=۰/۰۴۸۹).



شکل ۳- بررسی آماری تغییرات سطح بیان ژن‌های IDO1، VEGF و KRAS در گروه‌های مختلف با استفاده از روش Real-Time PCR، p≤0.05*

٤. بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار با رزوراترول می‌تواند توانایی مهاجرتی E-MenSCs و میزان بیان ژن‌های VEGF و KRAS را به طور معنی‌داری کاهش دهد. اکثر مطالعات آزمایشگاهی که تاکنون انجام شده‌اند، از سلول‌های استرومایی اندومتر زنان بیمار به عنوان مدلی برای بررسی اثر رزوراترول بر اندومتریوز استفاده کرده‌اند و این مطالعه، اولین پژوهشی است که اثر رزوراترول را بر میزان توانایی مهاجرتی و بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی بیماران مبتلا به اندومتریوز (به عنوان مدلی برای اندومتریوز) مورد مطالعه قرار داده است.

یافته‌های پژوهش نشان داد که با توجه به نتایج تست خراش (شکل ۲)، توانایی مهاجرت E-MenSCs –که با درصد بسته شدن خراش ارزیابی شد– به طور معناداری بیشتر از NE-MenSCs بود، که کاملاً با مطالعه قبلی که نشان داد E-MenSCs به میزان بالاتری MMP-2 و MMP-9 را – به عنوان ژن‌های ضروری در تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی مختلف – بیان می‌کنند، سازگار بود (۲۷). علاوه‌بر این، سایر محققان نشان داده‌اند که بافت‌ها و سلول‌های اندومتریوزی حاوی مقادیر بیشتری MMP در مقایسه با بافت‌های سالم هستند (۲۹، ۳۰). پیش‌تر، اثرات مهاری رزوراترول بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی نشان داده شده است. یانگ[1] و همکاران (۲۰۲۲)، اثرات رزوراترول و مکانیسم عمل احتمالی آن را بر سلول‌های رده سرطان معده انسانی (SGC7901) مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که تیمار سلول‌ها با رزوراترول باعث سرکوب تکثیر سلولی، مهار مهاجرت و تهاجم سلولی، و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده می‌شود. نتایج نشان داد که

1. Yang

رزوراترول با مهار بیان MALA1[1] چنین اثرات ضد سرطانی را ایجاد می‌کند (۳۱). به‌علاوه، نشان داده شده که رزوراترول مهاجرت و متاستاز را در لاین سلولی MDA-MB-231 سرطان پستان از طریق معکوس کردن گذار اپیتلیال- مزانشیمی القاء شده با TGF-β1، مهار می‌نماید (۳۲).

پیش‌تر، افزایش بیان IDO1 - به‌عنوان یک تعدیل‌کننده ایمنی- در بافت‌های اندومتر مشتق شده از اندومتریوز نشان داده شده است (۳۳). به‌علاوه، مون و همکاران (۲۰۰۵) IDO1 را به عنوان یک آنزیم درون‌سلولی توصیف کردند که در طول التهاب تنظیم می‌شود و پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلول‌های T را سرکوب می‌کند (۳۴). IDO1 در محل اتصال جنین و مادر[2] بیان می‌شود (۳۵) و اخیراً نشان داده شده است که نقش کلیدی در تکثیر، چسبندگی و تهاجم سلول‌های استرومای آندومتر (ESCs) دارد (۳۳، ۳۶). از سوی دیگر، گزارش شده است که پروتئین‌های Ras نقش کلیدی در کنترل فعالیت میتوژنیک و انکوژنیک تیروزین کینازها دارند. بنابراین، افزایش بقاء و تکثیر سلولی در نتیجه فعال‌سازی Ras ایجاد می‌شوند (۳۷، ۳۸). براساس نتایج پژوهش حاضر، IDO1 و KRAS (به عنوان بخشی از مسیر RAS/MAPK) در E-MenSCs در مقایسه با NE-MenSCs دچار فراتنظیمی شدند. این امر با مطالعات قبلی که نشان‌دهنده فعالیت بالاتر IDO1 در E-MenSCs (۳۹) و افزایش بیان ژن KRAS در بیماران مبتلا به اندومتریوز که دارای SNP در محل LCS6 واقع در 3'-UTR ژن KRAS هستند (۴۰)- که باعث تکثیر و تهاجم بیشتر سلول‌های استرومای اندومتر انسان (hESC) می‌شود- همسو است. از طرفی نشان داده شده که رزوراترول از تومورزایی در مدل‌های موشی سرطان کولورکتال فعال شده با KRAS از طریق سرکوب بیان انکوژنیک KRAS جلوگیری می‌کند (۴۱). هم‌راستا با این مطالعات، نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد میزان بیان KRAS در سلول‌های E-MenSCs نیز پس از تیمار با رزوراترول به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. با این حال تیمار با رزوراترول نتوانست میزان بیان IDO1 را در E-MenSCs کاهش دهد. این نتیجه با نتایج مطالعه لین[3] و همکاران (۲۰۱۷) مغایر بود. آنها از رزوراترول به عنوان عامل تحریک‌کننده Cx43[4] که فراتنظیمی آن در ایجاد ایمنی در ریز محیط توموری نقش دارد، استفاده کردند، تا از این طریق تاثیر Cx43 را بر تولید IDO به عنوان عاملی دخیل در مقاومت توموری بسنجند (۴۲). نتایج

1. Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
2. Feto-maternal interface
3. Lin
4. Connexin 43

به دست آمده در این مطالعه افزایش Cx43 را نشان داد، در حالی که پروتئین IDO و اثرات مهاری با واسطه IDO روی سلول‌های T پس از تیمار سلول‌های توموری با رزوراترول کاهش یافت.

تأمین خون برای ایجاد و تداوم ضایعات اندومتریوز، به ویژه در ریزمحیط صفاقی که در مقایسه با اندومتر یوتوپیک نسبتاً بدون عروق است، حیاتی می‌باشد (۴۳). VEGF یکی از مهم‌ترین عوامل رگ‌زایی در اندومتریوز است که می‌تواند تکثیر سلولی، مهاجرت سلولی و نفوذپذیری عروقی را افزایش دهد و ترشح آن در پاسخ به شرایط التهابی بالا، افزایش می‌یابد (۴۴، ۴۵). افزایش سطوح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به دلیل استرس اکسیداتیو در اندومتریوز هم می‌تواند بیان VEGF و رگ‌زایی آن را در شرایط in vivo و in vitro افزایش دهد (۴۶). در پژوهشی نشان داده شده که تیمار سلول‌های استرومایی اندومتر به‌جا (EuESCs) و نابه‌جا (EESCs) زنان مبتلا به اندومتریوز و سلول‌های استرومایی اندومتر زنان سالم (CESCs) با رزوراترول باعث کاهش سطح بیان ژن و پروتئین VEGF در هر سه گروه سلول‌ها می‌شود، اما اثر رزوراترول در کاهش بیان ژن VEGF از نظر آماری در EESCs در مقایسه با EuESCs و CESCs محسوس‌تر بود (۴۷). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از بیان پایه بالاتر VEGF در E-MenSCs نسبت به NE-MenSCs و همچنین تاثیر رزوراترول بر کاهش معنی‌دار بیان این ژن در سلول‌های بیمار بود.

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این مطالعه، رزوراترول ممکن است پیشرفت اندومتریوز را از طریق کاهش توانایی مهاجرت سلول‌های بنیادی خون قاعدگی زنان بیمار و هچنین فروتنظیمی ژن‌های VEGF و KRAS بهبود بخشد. با این حال، به منظور تعیین بهتر و دقیق‌تر اثر درمانی رزوراترول بر اندومتریوز، مطالعات بیشتری در خصوص تکثیر سلولی، رگ‌زایی، تهاجم، چسبندگی، آپوپتوز و سایر فرآیندهای دخیل در پاتوژنز اندومتریوز مورد نیاز است.

References

1. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R & von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(5): 617-30.
2. Artemova D, Vishnyakova P, Gantsova E, Elchaninov A, Fatkhudinov T & Sukhikh G. The prospects of cell therapy for endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2023; 40(5): 955-67.
3. Zondervan KT, Becker CM & Missmer SA. Endometriosis. *The New England journal of medicine*. 2020; 382(13): 1244-56.
4. Zhang L, Xiong W, Xiong Y, Liu H & Liu Y. 17 β-Estradiol promotes vascular endothelial growth factor expression via the Wnt/β-catenin pathway during the pathogenesis of endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2016; 22(7): 526-35.
5. Kajiyama H, Suzuki S, Yoshihara M, Tamauchi S, Yoshikawa N, Niimi K & et al. Endometriosis and cancer. *Free radical biology & medicine*. 2019; 133: 186-92.
6. Janša V, Klančič T, Pušić M, Klein M, Vrtačnik Bokal E, Ban Frangež H & et al. Proteomic analysis of peritoneal fluid identified COMP and TGFBI as new candidate biomarkers for endometriosis. *Scientific Reports.* 2021; 11(1): 20870.
7. Jiang L, Wan Y, Feng Z, Liu D, Ouyang L, Li Y & et al. Long Noncoding RNA UCA1 Is Related to Autophagy and Apoptosis in Endometrial Stromal Cells. *Frontiers in oncology.* 2020; 10: 618472.
8. Maruyama T. A Revised Stem Cell Theory for the Pathogenesis of Endometriosis. *Journal of personalized medicine.* 2022; 12(2).
9. Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *The American journal of pathology*. 1927; 3(2).
10. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG & Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics and gynecology.* 1984; 64(2): 151-4.
11. Sasson IE & Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008; 1127: 106.
12. Gargett CE & Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Molecular human reproduction.* 2010; 16(11): 818-34.
13. Gargett CE, Schwab KE, Brosens JJ, Puttemans P, Benagiano G & Brosens I. Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis. *Molecular human reproduction.* 2014; 20(7): 591-8.
14. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J & et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of translational medicine.* 2007; 5(1): 1-10.
15. Murphy MP, Wang H, Patel AN, Kambhampati S, Angle N, Chan K & et al. Allogeneic endometrial regenerative cells: An" Off the shelf solution" for critical limb ischemia? *Journal of translational medicine.* 2008; 6(1): 1-8.
16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D & et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International

Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315-7.
17. Kazemnejad S, Zarnani A-H, Khanmohammadi M & Mobini S. Chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on nanofibrous scaffolds. *Stem Cell Nanotechnology*. 2013.1058: 149-69.
18. Khanjani S, Khanmohammadi M, Zarnani AH, Talebi S, Edalatkhah H, Eghtesad S & et al. Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from menstrual blood-derived stem cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2015; 9(11): E124-E3.
19. Khanjani S, Khanmohammadi M, Zarnani A-H, Akhondi M-M, Ahani A, Ghaempanah Z & et al. Comparative evaluation of differentiation potential of menstrual blood-versus bone marrow-derived stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One.* 2014; 9(2): e86075.
20. Sahraei SS, Davoodi Asl F, Kalhor N, Sheykhhasan M, Fazaeli H, Moud SS & et al. A Comparative Study of Gene Expression in Menstrual Blood-Derived Stromal Cells between Endometriosis and Healthy Women. *BioMed Research International.* 2022. **DOI:** 10.1155/2022/7053521
21. Kalaitzopoulos DR, Samartzis N, Kolovos GN, Mareti E, Samartzis EP, Eberhard M & et al. Treatment of endometriosis: a review with comparison of 8 guidelines. *BMC women's health.* 2021; 21(1): 397.
22. Chen J, Wang H, Dong Z, Liu J, Qin Z, Bao M & et al. GnRH-a-Induced Perimenopausal Rat Modeling and Black Cohosh Preparations' Effect on Rat's Reproductive Endocrine. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021; 12.
23. Della Corte L, Noventa M, Ciebiera M, Magliarditi M, Sleiman Z, Karaman E & et al. Phytotherapy in endometriosis: an up-to-date review. *Journal of complementary & integrative medicine*. 2020; 17(3).
24. Zakhari A, Delpero E, McKeown S, Tomlinson G, Bougie O & Murji A. Endometriosis recurrence following post-operative hormonal suppression: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2021; 27(1): 96-107.
25. Jiang T, Chen Y, Gu X, Miao M, Hu D, Zhou H & et al. Review of the Potential Therapeutic Effects and Molecular Mechanisms of Resveratrol on Endometriosis. *International journal of women's health*. 2023; 15.
26. Bruner-Tran KL, Osteen KG, Taylor HS, Sokalska A, Haines K & Duleba AJ. Resveratrol inhibits development of experimental endometriosis in vivo and reduces endometrial stromal cell invasiveness in vitro. *Biology of reproduction.* 2011; 48(1).
27. Sahraei SS, Davoodi Asl F, Kalhor N, Sheykhhasan M, Fazaeli H, Moud SS & et al. A Comparative Study of Gene Expression in Menstrual Blood-Derived Stromal Cells between Endometriosis and Healthy Women. *Biomed Res Int.* 2022; 2022: 7053521.
28. Kolahdouz-Mohammadi R, Shidfar F, Khodaverdi S, Arablou T, Heidari S, Rashidi N & et al. Resveratrol treatment reduces expression of MCP-1, IL-6, IL-8 and RANTES in endometriotic stromal cells. *J Cell Mol Med.* 2021; 25(2): 1116-27.
29. Dufour A, Sampson NS, Zucker S & Cao J. Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *J Cell Physiol.* 2008; 217(3): 643-51.
30. Matsuzaki S & Darcha C. Involvement of the Wnt/β-catenin signaling pathway in the

cellular and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis. *PLoS One.* 2013; 8(10): e76808.

31. Yang Z & Xia L. Resveratrol inhibits the proliferation, invasion, and migration, and induces the apoptosis of human gastric cancer cells through the MALAT1/miR-383-5p/DDIT4 signaling pathway. *Journal of Gastrointestinal Oncology.* 2022; 13(3): 985-96.
32. Sun Y, Zhou QM, Lu YY, Zhang H, Chen QL, Zhao M & et al. Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF-β1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2019; 24(6).
33. Mei J, Jin LP, Ding D, Li MQ, Li DJ & Zhu XY. Inhibition of IDO1 suppresses cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression and decreases proliferation, adhesion and invasion of endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 2012; 18(10): 467-76.
34. Munn DH, Mellor AL, Rossi M & Young JW. Dendritic cells have the option to express IDO-mediated suppression or not. *Blood.* 2005; 105(6): 2618.
35. Jeddi-Tehrani M, Abbasi N, Dokouhaki P, Ghasemi J, Rezania S, Ostadkarampour M & et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the endometrium of cycling mice throughout the oestrous cycle. *J Reprod Immunol.* 2009; 80(1-2): 41-8.
36. Yang H-L & Li M-Q. Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Endometriosis. *Reproductive and Developmental Medicine.* 2019; 3(2): 110-6.
37. Young A, Lou D & McCormick F. Oncogenic and Wild-type Ras Play Divergent Roles in the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Cancer Discovery.* 2013; 3(1): 112-23.
38. Schubbert S, Shannon K & Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews Cancer.* 2007; 7(4): 295-308.
39. Nikoo S, Ebtekar M, Jeddi-Tehrani M, Shervin A, Bozorgmehr M, Vafaei S & et al. Menstrual blood-derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20(9): 905-18.
40. Grechukhina O, Petracco R, Popkhadze S, Massasa E, Paranjape T, Chan E & et al. A polymorphism in a let-7 microRNA binding site of KRAS in women with endometriosis. *EMBO molecular medicine.* 2012; 4(3): 206-17.
41. Saud SM, Li W, Morris NL, Matter MS, Colburn NH, Kim YS & et al. Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. *Carcinogenesis.* 2014; 35(12): 2778-86.
42. Lin H-C, Yang C-J, Kuan Y-D, Wang W-K, Chang W-W & Lee C-H. The inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by connexin 43. *International Journal of Medical Sciences.* 2017; 14(12): 1181-8.
43. Kolahdouz Mohammadi R & Arablou T. Resveratrol and endometriosis: In vitro and animal studies and underlying mechanisms (Review). *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2017; 91: 220-8.

44. Gazvani R & Templeton A. Peritoneal environment ,cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction (Cambridge, England).* 2002; 123(2): 217-26.
45. Rocha AL, Reis FM & Taylor RN. Angiogenesis and endometriosis. *Obstetrics and gynecology international*. 2013; 2013: 859619.
46. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M & et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1996; 98(7): 1667-75.
47. Arablou T, Aryaeian N, Khodaverdi S, Kolahdouz-Mohammadi R, Moradi Z, Rashidi N & et al. The effects of resveratrol on the expression of VEGF, TGF-β, and MMP-9 in endometrial stromal cells of women with endometriosis. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 6054.