

بررسی تأثیر داروی آتورواستاتین بر کشت بافت اندومتر انسان در زمینه سه بعدی فیبرینی

آزاده منتصری (M.Sc.)^۱، مظفر خزاعی (Ph.D.)^۱، رستم قربانی (Ph.D.)^۱، منصور رضایی (Ph.D.)^۱

۱- مرکز تحقیقات تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آندومتریوز به عنوان یکی از عوامل اصلی ناباروری در زنان تحقیقات گسترده‌ای را به خود اختصاص داده است. کشت بافت اندومتر انسانی در زمینه سه بعدی فیبرینی به عنوان مدل مناسبی برای بیماری اندومتریوز مطرح می‌باشد. استاتینها به‌عنوان داروهایی با اثرات متنوع در رگ‌زایی به عنوان کاندیدای برای مهار این بیماری مطرح می‌باشند. لذا هدف مطالعه حاضر، شناسایی تأثیر غلظت‌های مختلف آتورواستاتین بر کشت بافت اندومتر انسانی به منظور تعیین اثرات مهار یا تسریع‌کننده آن بر رشد بافت می‌باشد.

روش بررسی: ۸ نمونه بافت اندومتر طبیعی انسان به قطعات $1 \times 1 \text{ mm}$ تقسیم و در ظروف ۲۴ خانه، کشت داده شدند. برای تشکیل مدل سه بعدی مورد نظر ابتدا به هر خانه از ظرف کشت 0.1 ml محلول فیبرینوژن در محیط M199 با غلظت 3 mg/ml و $10 \mu\text{L}$ ترومبین اضافه گردید. پس از تشکیل ژل، قطعات بافت اندومتر در سطح آن قرار داده شد و لایه دوم از محلول فیبرینوژن اضافه گردید. قطعات بافت اندومتر هر نمونه در ۴ ردیف ۵ تایی چاهک‌های ظرف کشت داده شدند. ردیف اول به عنوان کنترل محیط کشت و ردیف‌های دوم تا چهارم به ترتیب غلظت‌های $1 \mu\text{M}$ ، $10 \mu\text{M}$ و $100 \mu\text{M}$ از آتورواستاتین به چاهکها اضافه گردید. هر ۷۲ ساعت تعویض محیط انجام شد و تغییرات ایجاد شده در بافتها با استفاده از میکروسکوپ معکوس ثبت گردید. همچنین در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ از نمونه‌ها عکسبرداری صورت گرفت. در پایان دوره مطالعه، به بافت‌های کشت داده شده براساس مشاهده رشد زوائد سلولی، هجوم سلول‌های رسوب یافته به درون ژل فیبرین و رشد غدد آندومتری نمره داده شد و تصاویر مربوط به کشت سه بعدی آنالیز شد. همچنین به منظور تأیید ساختارهای سلولی رشد یافته در ژل، برش‌های پارافینی به دست آمده از نمونه‌های کشت داده شده به روش ایمونوهیستوشیمی و با آنتی ویمنتین، آنتی سیتوکراتین و آنتی CD31 رنگ آمیزی شدند. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵) استفاده شد. داده‌های مربوط به نمره دهی بافتها توسط آزمون آماری فریدمن و داده‌های حاصل از آنالیز تصاویر توسط آزمون آماری ANOVA یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: تغییرات رشد در گروه کنترل، $82/5\%$ و در گروه $1 \mu\text{M}$ ، $87/5\%$ بود که اختلاف آنها معنی‌دار بود ($p < 0/05$). این تغییرات در گروه $1 \mu\text{M}$ ، 50% و در گروه $10 \mu\text{M}$ ، 5% بود که اختلاف آنها نیز با گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0/01$). نتیجه‌گیری: داروی آتورواستاتین در غلظت‌های مختلف دارای اثرات متفاوتی بر رشد بافت اندومتر کشت داده شده می‌باشد به طوری که با دوز $10 \mu\text{M}$ باعث افزایش رشد و دوزهای $1 \mu\text{M}$ و $10 \mu\text{M}$ باعث کاهش رشد می‌گردد. مطالعات تکمیلی در مدل‌های حیوانی در این زمینه توصیه می‌شود.

کلید واژگان: آتورواستاتین، اندومتر، اندومتریوز، کشت سه بعدی، رشد بافت، فیبرین، ترومبین.

مسئول مکاتبه: آزاده منتصری، مرکز تحقیقات تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

پست الکترونیک: montaseri_azi@yahoo.com

زمینه و هدف

اندومتريوز ضایعه‌ای است که با وجود غدد و سلول‌های استرومای اندومتر در خارج از حفره رحمی مشخص می‌شود (۱). این بیماری از شایع‌ترین اختلالات زنان و مامایی است که حداقل ۱۰٪ زنان در سنین باروری و ۵۰٪ زنان نابارور به آن مبتلا می‌شوند (۲). تاکنون هیچ درمان دارویی یا جراحی جهت ریشه‌کنی این بیماری بدون داشتن عوارض جانبی شناخته نشده است (۳). جراحی به عنوان خط اول درمان به منظور از بین بردن ضایعات اندومتريوزی می‌باشد. اما در ۴۷٪ از بیماران عود مجدد بیماری پس از جراحی گزارش شده است (۴).

از بین تئوری‌های مختلفی که در زمینه پاتوژنز این بیماری بیان شده است، تئوری بازگشت خون قاعدگی^۱ از طریق لوله‌های رحمی به حفره صفاقی بیش از سایرین مورد تأیید قرار گرفته است (۵). قطعات بافت اندومتر در حفره صفاقی دو رفتار اساسی را از خود نشان می‌دهند که عبارت از لانه‌گزینی و ایجاد عروق خونی جدید از طریق فرآیند رگ‌زایی^۲ می‌باشد (۶).

اندومتريوز در انسان و پریمات‌های نزدیک به انسان که دارای قاعدگی هستند دیده می‌شود. بنابراین مطالعه و بررسی علمی در مورد این بیماری، خصوصاً شناسایی مراحل اولیه ایجاد و تثبیت آن با مشکلات متعددی همراه است. بدین منظور تحقیقات فراوانی جهت ابداع مدلی که قادر به تقلید مراحل ابتدایی بیماری اندومتريوز باشد صورت گرفته است.

Fasciani و همکاران مدل کشت سه بعدی قطعات بافت اندومتر تکثیری را در زمینه فیبرینی معرفی کردند و با توجه به تکثیر سلول‌های استروما، ایجاد غدد و عروق جدید، آنرا به عنوان مدل مناسبی برای مطالعه مراحل اولیه اندومتريوز معرفی کردند (۷). سپس خزاعی و

همکاران ثابت کردند که قطعات بافت اندومتر فاز ترشحي نیز توانایی تکثیر، رشد، تجدید ساختار و رگ‌زایی در زمینه سه بعدی فیبرینی را داشته و کشت اندومتر ترشحي، سازگاری بیشتری با پاتوژنز اندومتريوز دارد (۸). همچنین آنها با کشت سلول‌های اندومتر انسانی در زمینه سه بعدی فیبرینی در همین رابطه، موفق به ایجاد شبکه ظرف مویرگی شدند (۹). با توجه به این مسئله که اندومتريوز از دسته بیماری‌های مرتبط با آنژیوژنز می‌باشد، به نظر می‌رسد استفاده از ترکیباتی که قادر به مهار فرآیند آنژیوژنز می‌باشند دارای اثراتی بر این بیماری خواهد بود.

از جمله ترکیبات دارویی که تأثیرات آنها بر فرآیند رگ‌زایی مورد بررسی قرار گرفته است، استاتینها می‌باشند. دسته دارویی مهارکننده آنزیم ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-Co A) که به استاتینها معروف هستند، به طور وسیعی جهت درمان افزایش کلسترول خون مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰). این داروها مسیر تبدیل موالونات^۳ به HMG-CoA را مهار می‌کنند و در نتیجه تولید کلسترول را کاهش می‌دهند (۱۱).

تحقیقات نشان داده‌اند که استاتینها علاوه بر اثرات کاهش دهنده سطح چربی خون دارای تأثیرات وسیعی بر فرآیند التهاب و رگ‌زایی می‌باشند (۱۲). به نظر می‌رسد که استاتینها به طور بالقوه دارای اثرات دوگانه‌ای بر فرآیند آنژیوژنز باشند. Laufs و همکاران گزارش کردند که دوزهای پایین استاتین از طریق افزایش تولید اکسیدنیتریک (NO) منجر به تحریک رگ‌زایی می‌شوند؛ در حالی که این ترکیبات در دوزهای بالا prenylation پروتئینها را کاهش داده و باعث مهار رشد سلولی می‌شوند (۱۳). براساس مطالعه اسفندیاری و همکاران داروی لوواستاتین در غلظت‌های ۱ μM، ۵ μM و ۱۰ μM قادر به مهار پدیده آنژیوژنز می‌باشد؛

1- Retrograde menstruation

2- Angiogenesis

3- Mevanolate

از جراحی بود. قبل از اقدام به هیستریکتومی فرم رضایت‌نامه توسط کلیه بیماران کامل گردید.

کشت بافت اندومتر: قطعات بافت اندومتر از رحم‌های هیستریکتومی شده برداشته شد و چندین مرتبه با محلول Hank's (Sigma, Germany) استریل و دارای آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد و از هر نمونه ۲۰ قطعه $1 \times 1 \text{ mm}$ مناسب تهیه گردید. قطعات بافتی در ظروف کشت ۲۴ خانه^۲ (Nunc, Denmark) و بین دو لایه ژل فیبرینی کاشته شدند. در ابتدا به هر خانه این ظرف، 0.5 ml محلول فیبرینوژن (Sigma, Germany) 3 mg/ml حل شده در محیط کشت M199 (GIBCO, Germany) و $10 \mu\text{l}$ ترومبین (Sigma, Germany) اضافه گردید. ظروف کشت در انکوباتور (Mettler, Germany) با درجه حرارت 37°C ، $95\% \text{ O}_2$ ، $5\% \text{ CO}_2$ و رطوبت 95% قرار داده شدند. پس از تشکیل ژل فیبرین، قطعات بافت اندومتر در سطح هر خانه قرار داده شد و لایه دوم محلول فیبرینوژن و ترومبین به آن اضافه شد. در هر ظرف کشت، چاهک‌های ردیف اول به عنوان گروه کنترل، ردیف دوم گروه $0.1 \mu\text{M}$ ، ردیف سوم گروه $1 \mu\text{M}$ و ردیف چهارم به عنوان گروه $10 \mu\text{M}$ در نظر گرفته شد. خانه‌های کنترل 1 ml از محیط کشت M199 حاوی FBS به میزان 5% (GIBCO, Germany)، e-aminocaproic acid به میزان 0.1% (Sigma, Germany)، L-glutamin با غلظت 2 mM (GIBCO, Germany)، بی‌کربنات سدیم با غلظت $2/2 \text{ gr}$ (Merck, Germany) و آنتی‌بیوتیک (آمپوتریسیسین $2/5 \mu\text{g/ml}$ ، پنی‌سیلین 50 IU/ml و استرپتومایسین $50 \mu\text{g/ml}$) (GIBCO, Germany) و گروه‌های آزمایش به ترتیب دوزهای $0.1 \mu\text{M}$ ، $1 \mu\text{M}$ و $10 \mu\text{M}$ آتورواستاتین را دریافت نمودند. ظروف کشت طی دوره مطالعه در انکوباتور نگهداری شدند. هر ۷۲ ساعت یکبار، تعویض محیط کشت مربوط به تمامی گروه‌های کنترل و دارو صورت گرفت و بافت‌های کشت

اما مهار رشد و تکثیر سلولی فقط در دوزهای $5 \mu\text{M}$ و $10 \mu\text{M}$ رخ می‌دهد (۱۴).

آتورواستاتین (Lipitor, Pfizer) از دیگر ترکیبات خانواده استاتینها می‌باشد که نسبت به سایر اعضای این خانواده دارای عوارض جانبی کمتر و اثر بخشی بیشتری می‌باشد (۱۵). این دارو علاوه بر کاهش سطح کلسترول سرم، طیفی از اثرات ضد التهابی، ضد انعقادی و تثبیت ضایعات آترواسکلروزی را نیز دارا می‌باشد (۱۶).

با توجه به مشکلات موجود در مطالعات انسانی و مسائل مربوط به نگهداری و ایجاد اندومتريوز تجربی در مدل‌های حیوانی نزدیک به انسان (پریماتها)، استفاده از کشت سه بعدی بافت اندومتر در زمینه فیبرینی می‌تواند مدل مناسبی برای بررسی اثر داروها و عوامل مؤثر بر بیماری اندومتريوز باشد. علت انتخاب زمینه فیبرینی، وجود فیبرین در مایع صفاقی بیماران مبتلا به اندومتريوز به عنوان زمینه خارج سلولی مورد نیاز سلول‌های اندومتري می‌باشد. در مطالعه حاضر، تأثیر غلظت‌های مختلف داروی آتورواستاتین بر کشت بافت اندومتر انسانی در زمینه سه بعدی فیبرینی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌ها: نمونه‌های مورد استفاده برای کشت بافت اندومتر از ۸ بیماری که در سن باروری بودند و به منظور درمان بیماری‌های خوش‌خیم رحمی مانند فیبروم یا میوم در مرکز آموزشی-درمانی معتضدی کرمانشاه تحت جراحی هیستریکتومی قرار گرفته بودند تهیه گردید. معیارهای خروج^۱ از مطالعه شامل بدخیمی‌های اندومتر (پولیپها، هایپر پلازی و سرطان)، مصرف هورمون، درمان با آگونیست‌های GnRH یا استفاده از دستگاه داخل رحمی (IUD)^۲ طی سه ماه قبل

1- Exclusion criteria

2- Intra Uterine Device

3- Well

پارافینی به منظور تأیید ساختارهای سلولی رشد یافته درون ژل فیبرین، با روش ایمنو-هیستوشیمی و با آنتی‌ویمنتین (شاخص سلول‌های استرومای اندومتر)، آنتی‌سیتوکراتین (شاخص سلول‌های اپی‌تلیال) و آنتی CD31 (شاخص سلول‌های آندوتلیال) رنگ‌آمیزی شدند.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌های حاصل از آنالیز عکسها توسط آزمون آماری ANOVA یکطرفه و آزمون Tukey's Post Hoc و داده‌های مربوط به نمره‌دهی بافتها توسط آزمون فریدمن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در تمامی گروه‌ها، $p < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مهمترین تغییرات بافتی که طی هفته اول در بافتها مشاهده شد، شامل رشد زوائد بافتی و هجوم سلولها به داخل ژل فیبرین و تشکیل انشعابات سلولی طویل بود (شکل ۱- الف و ب). نکته قابل توجه در انتهای هفته اول وجود بیرون زدگی‌های شعاعی در اطراف بافت اصلی (شکل ۲) در ۹۲/۵٪ از خانه‌های گروه کنترل بود. ساختارهای مشابه در ۸۲/۵٪ در گروه $1 \mu M$ ، ۰/۱، ۵۰٪ در گروه $1 \mu M$ و ۵٪ در گروه $10 \mu M$ مشاهده شد (شکل ۲).

طی هفته دوم، سلول‌های رسوب یافته کم کم حالت کلونی‌های سلولی منظم را به خود گرفتند که دارای

داده شده توسط میکروسکوپ معکوس^۱ (Motic-AE31, Spain) و با بزرگنمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده در بافتها شامل ظاهر بافت اصلی، رسوب سلولی، ایجاد زوائد بافتی، رشد و تغییر شکل ایجاد شده در توده اصلی و ایجاد توده‌های غده‌ای شکل نیز ثبت شدند. در آخرین روز مطالعه (روز بیست و یکم)، طبق جدول معیارها (جدول ۱) نمره‌دهی بافتها توسط دو نفر به صورت مجزا انجام و میانگین نمرات مورد استفاده قرار گرفت. نمره دهی بر اساس مشاهده تغییرات مربوط به توده اصلی بافت، رشد و ایجاد زوائد سلولی، جدا شدن سلولها از توده اصلی و ایجاد رسوب سلولی، رشد و توسعه غدد اندومتری، تغییر شکل سلول‌های استروما و اپی‌تلیال و هجوم سلول‌های اندومتر به ژل فیبرینی در هر چاهک کشت انجام شد.

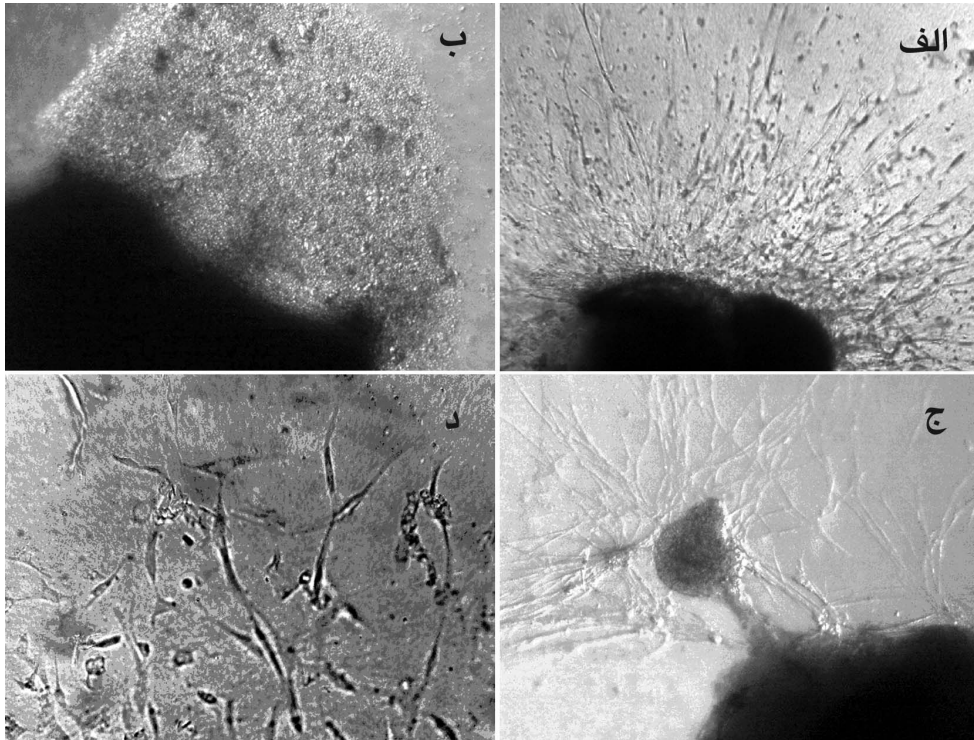
آنالیز تصاویر: تصاویر حاصل از قطعات بافت اندومتر با استفاده از نرم افزار تحلیل گر Motic مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با استفاده از این نرم افزار، ابتدا مساحت بافت کشت داده شده اصلی اندازه‌گیری شد و در ادامه مساحت کل زوائد بافتی که در اطراف بافت اصلی رشد نمودند محاسبه گردید. به منظور به دست آوردن شاخص رشد زوائد^۲ از فرمول زیر استفاده شد: شاخص رشد زوائد = (مساحت کل زوائد بافتی - مساحت بافت کشت داده شده اصلی) (۷).

رنگ‌آمیزی ایمنو-هیستوشیمی پس از پایان دوره مطالعه، قطعات بافت اندومتر که در بین دو لایه ژل فیبرین قرار گرفته بودند از خانه‌های کشت خارج شده و در محلول پارافرمالدئید ۴٪ قرار داده شدند. در ادامه به منظور بررسی ساختار بافتی، فرآیند آماده‌سازی و قالب‌گیری انجام گردید و سپس مقاطع پارافینی ۷-۵ میکرونی از آنها تهیه و لامها با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند. همچنین تعدادی از برش‌های

- 1- Invert
2- Outgrowth index

جدول ۱- معیارهای نمره‌دهی بافت اندومتر کشت داده شده در بررسی تأثیر داروی آتورواستاتین بر کشت بافت اندومتر انسانی در زمینه سه بعدی فیبرینی

نمره	ویژگی‌های بافتی
صفر	بافت اندومتر رشد نداشته و تغییرات فوق مشاهده نمی‌شوند
یک	بافت رشد اندکی داشته و ۲۰٪ تغییرات نامبرده در بافت کشت داده شده مشاهده می‌شود.
دو	رشد بافت در حد متوسط بوده و ۵۰-۲۰٪ تغییرات فوق در قطعه بافتی مشاهده می‌شود.
سه	رشد بافت خوب بوده و ۷۵-۵۰٪ تغییرات فوق در قطعه بافتی مشاهده می‌شوند.
چهار	بافت رشد عالی داشته و بیش از ۷۵٪ تغییرات فوق در قطعه بافتی مشاهده می‌شود.



شکل ۱- تصاویر مربوط به رشد بافت اندومتر کشت داده شده در زمینه سه بعدی فیبرینی، الف) نفوذ زوائد رشد یافته و طویل بافتی به درون ژل فیبرین (بزرگنمایی $10 \times$)، ب) رسوبات سلولی فراوان در اطراف بافت اصلی (بزرگنمایی $10 \times$)، ج) بیرون زدگی‌های غده‌ای شکل از بافت اندومتر (بزرگنمایی $10 \times$)، د) رشد سلول‌های استروما در سطح ژل فیبرین (بزرگنمایی $40 \times$)

آنالیز آماری داده‌های حاصل از نمره‌دهی بافتها (جدول ۲) نشان داد میانگین نمرات گروه کنترل برابر با $3/43 \pm 0/85$ در گروه $1 \mu M$ برابر با $2/41 \pm 0/84$ ، گروه $0/1 \mu M$ برابر با $3/43 \pm 0/85$ و گروه $10 \mu M$ برابر با $0/49 \pm 0/73$ بود. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، میانگین نمرات مربوط به گروه $0/1 \mu M$ از سایر گروه‌ها و حتی از گروه کنترل بالاتر می‌باشد.

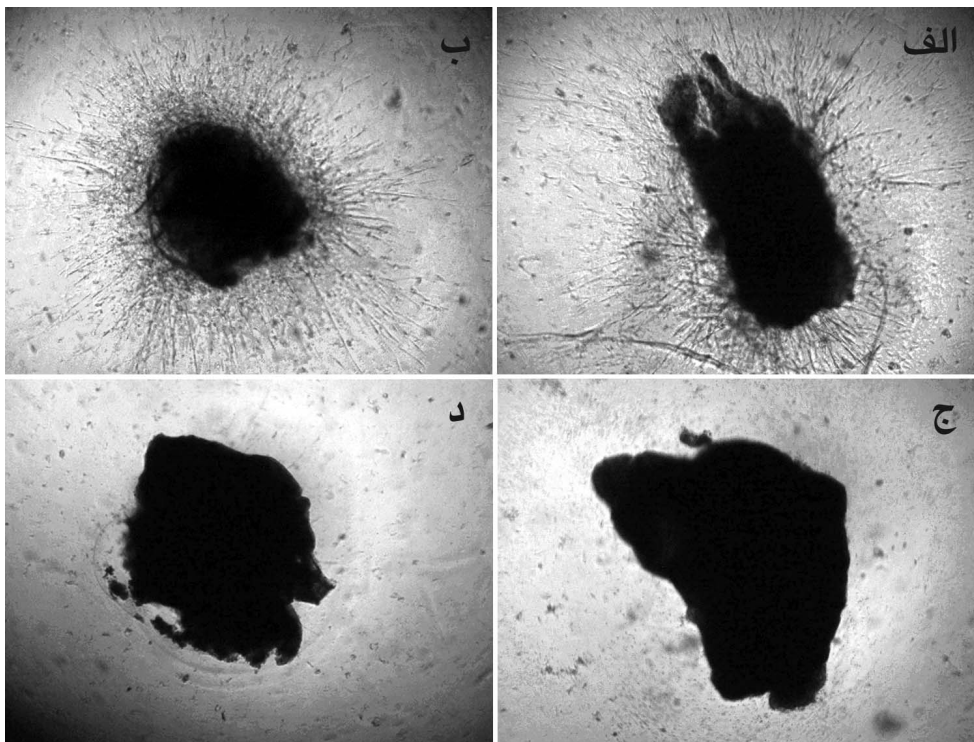
در بخش مربوط به آنالیز تصاویر، متوسط شاخص رشد زوائد بافتی در گروه کنترل با $128019/95 \mu m$ ، در گروه $0/1 \mu M$ برابر با $121891/89 \mu m$ ، در گروه $1 \mu M$ برابر با $86481/60 \mu m$ و در گروه $10 \mu M$ برابر با $31552/21 \mu m$ بود (نمودار ۱).

این نتایج نشان می‌دهد که غلظت $0/1 \mu M$ داروی آتورواستاتین، رشد زوائد بافتی را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش می‌دهد؛ در حالی که غلظت $10 \mu M$ آتورواستاتین باعث کاهش

ساختار غده‌ای شکل بودند و زوائد بافتی هم بیش از پیش رشد نموده و طویل شده بودند (شکل ۱، ج). در طی هفته سوم رشد، تغییر قابل توجهی شامل رشد سلول‌های استرومای دوکی و ستاره‌ای شکل در اطراف بافت اصلی مشاهده شد (شکل ۱، د). در گروه $1 \mu M$ و $10 \mu M$ رشد بافتها تنها محدود به شکل‌گیری رسوبات سلولی در اطراف بافت اصلی بود که بر خلاف گروه کنترل و $0/1 \mu M$ این رسوبات در ادامه رشد حالت غده‌ای شکل به خود نگرفته و رشد آنها متوقف گردید.

جدول ۲- شاخص‌های آماری مربوط به نمره‌دهی قطعات بافت اندومتر کشت داده شده در زمینه سه بعدی فیبرینی

شاخص‌های آماری گروه‌های مورد بررسی	تعداد قطعات کاشته شده	میانگین رشد و انحراف معیار ($M \pm SD$)	حداقل رشد	حداکثر رشد
کنترل	۴۰	$3/1 \pm 0/84$	۱/۰۰	۴/۰۰
$0/1 \mu M$	۴۰	$3/43 \pm 0/85$	۱/۰۰	۴/۰۰
$1 \mu M$	۴۰	$2/41 \pm 0/84$	۰/۰۰	۴/۰۰
$10 \mu M$	۴۰	$0/49 \pm 0/73$	۰/۰۰	۲/۰۰



شکل ۲- تصاویر مربوط به کشت بافت اندومتر در زمینه سه بعدی فیبرینی در روز هفتم کشت (بزرگنمایی $\times 4$)، الف) رشد زوائد و نفوذ آنها به ژل در گروه کنترل، ب) رشد زوائد و بیرون زدگی‌های بافتی در گروه $1 \mu M$ ، ج و د) عدم رشد توده اصلی و زوائد در گروه $1 \mu M$ و $10 \mu M$

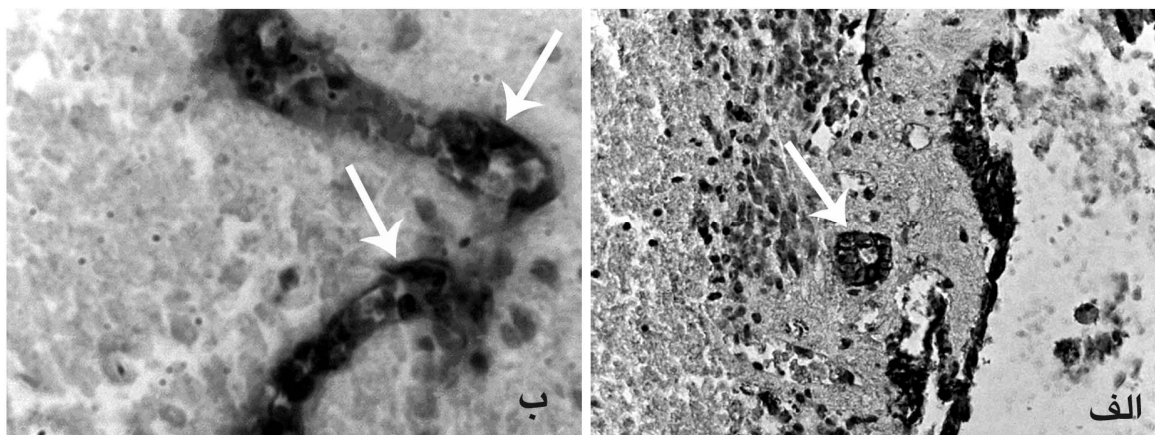
آنتی CD31 واکنش مثبت دارد (شکل ۳، الف و ب).

بحث

در مطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف داروی آتورواستاتین ($1 \mu M$ ، $10 \mu M$ ، $0.1 \mu M$) بر بافت اندومتر انسانی کشت داده شده در زمینه سه بعدی فیبرینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه

معنی‌دار میزان رشد زوائد ($p < 0.05$) و غلظت $10 \mu M$ آتورواستاتین نیز به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان رشد زوائد سلولی ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد.

همچنین رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برش‌های پارافینی نشان می‌دهد که کشت قطعات بافت اندومتر با آنتی‌بادی‌های آنتی‌ویمنتین، آنتی‌سیتوکراتین و



شکل ۳- الف) برش پارافینی رنگ‌آمیزی شده با Anti-cytokeratin نشان دهنده سلول‌های اپلی‌تلیال سیتوکراتین مثبت، ب) برش پارافینی رنگ‌آمیزی شده با Anti-CD31 نشان دهنده سلول‌های آندوتلیال CD31 (بزرگنمایی $\times 100$)

نشان داد که آتورواستاتین دارای اثرات دوگانه‌ای بر رشد بافت اندومتر می‌باشد، به طوری که این دارو در دوز پایین ($0.1 \mu M$) منجر به افزایش رشد بافت در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. اما دوزهای بالاتر آتورواستاتین ($1 \mu M$ و $10 \mu M$) رشد را نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهند که این کاهش رشد شامل کاهش تکثیر سلولی و کاهش میزان رگ‌زایی می‌باشد.

فرآیند رگ‌زایی در بافت اندومتر نابجا^۱ به عنوان یکی از مکانیزم‌های مهم در پاتورن‌ز بیماری اندومتريوز شناخته شده است (۹). درمان‌های دارویی جدید بیماری اندومتريوز براساس استفاده از ترکیباتی بنیان شده‌اند که قادر به مهار پدیده رگ‌زایی باشند. مطالعات موجود در زمینه تأثیر استاتین‌ها بر پدیده رگ‌زایی تا حدودی متضاد می‌باشد.

Vincent و همکاران بیان کردند استاتین‌ها قادر به کاهش تکثیر سلول‌های آندوتلیال و مهاجرت آنها می‌باشند (۱۶)؛ در حالی که Kureishi و همکاران گزارش کردند داروی سیمواستاتین^۲ محرک پدیده رگ‌زایی می‌باشد که احتمالاً از طریق فعال‌سازی فاکتور پروتئین کیناز Akt/Pk B سلول‌های آندوتلیال این اثر را اعمال می‌کنند (۱۷).

Weis و همکاران گزارش کردند که استاتین‌ها دارای اثرات وابسته به دوز دوگانه‌ای در رگ‌زایی هستند که به صورت مستقل از تأثیر این ترکیبات بر میزان چربی خون می‌باشد. آنها بیان کردند تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های آندوتلیال در غلظت‌های پایین ($0.1 \mu M$) - $0.005 \mu M$) استاتین‌ها افزایش یافته اما به طور مشخصی در غلظت‌های بالا ($1 \mu M$ - $0.005 \mu M$) کاهش می‌یابد. همچنین این محققین بیان کردند که اثرات ضد رگ‌زایی استاتین‌ها در غلظت‌های بالا در ارتباط با کاهش ترشح VEGF از سلول‌های آندوتلیال و همچنین افزایش آپوپتوز در این سلولها می‌باشد (۱۸). نتیجه به دست آمده از مطالعه

Weis و همکاران با نتیجه مطالعه ما مشابه است، لازم به ذکر است که در مطالعه Weis اثرات استاتین‌ها بر سلول‌های آندوتلیال بررسی شده است که احتمالاً همین امر علت اختلاف دوز دارویی به کار گرفته شده می‌باشد. Rorowski و همکاران بیان کردند که استاتین‌ها دارای اثرات پیش‌رگ‌زایی^۳ بوده که منجر به تحریک رشد عروق جدید می‌شوند و همچنین تولید اکسیدنیتریک (NO) توسط سلول‌های آندوتلیال را افزایش می‌دهند (۱۹).

Walter و همکاران بیان کردند که استاتین‌ها باعث حرکت و تمایز سلول‌های اجدادی آندوتلیال مشتق شده از مغز استخوان می‌شوند که رگ‌زایی و ایجاد پوشش آندوتلیالی مجدد را سبب می‌شود (۲۰). اسفندیاری و همکاران در طی مطالعه مشابهی غلظت‌های $1 \mu M$ ، $5 \mu M$ و $10 \mu M$ داروی لوواستاتین را بر کشت بافت اندومتر انسانی نشان دادند. آنها بیان کردند که داروی لوواستاتین در غلظت‌های ذکر شده دارای اثرات مهارکننده رشد بافت اندومتر می‌باشد و هیچگونه اثر دوگانه‌ای را گزارش نکردند (۱۴). درحالی که در مطالعه حاضر نشان داده شد که داروی آتورواستاتین دارای تأثیرات وابسته به دوز دوگانه‌ای بر رشد بافت اندومتر انسانی در محیط کشت سه بعدی فیبرین می‌باشد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که استفاده از استاتین‌ها به عنوان داروی جدید جهت درمان بیماری اندومتريوز قادر به مهار رشد بافت اندومتر نابجا باشد. از طرف دیگر اندومتريوز بیماری وابسته به استروژن^۴ می‌باشد (۲۲) و همانطور که قبلاً اشاره شد استاتین‌ها منجر به مهار سنتز کلسترول می‌شوند. کلسترول یکی از پیش‌سازهای لازم جهت ساخت هورمون‌های استروئیدی از جمله استروژن است. با توجه به این مساله می‌توان احتمال داد که استاتین‌ها قادر به کاهش سنتز هورمون استروژن هستند که این می‌تواند یکی از

3- Pre-angiogenesis
4- Estrogen-dependent

1- Ectopic
2- Simvastatin

درمان اندومتريوز و ساير بيماري‌هاي وابسته به آنژیوژنز توسط اين دسته دارويي باشد. مطالعات In vitro و In vivo بيشترى جهت شناسايى تأثيرات بالقوه استاتينها در پيشگيري و مهار پيشرفت بيماري اندومتريوز پيشنهاده مى‌شود.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله تشکر صمیمانه خود را از جناب آقایان دکتر پرویز صیادی و دکتر سید حمید مدنی بابت کمک در انجام پروژه اعلام می‌دارند. همچنین از معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه به دلیل تصویب این طرح تحقیقاتی و تأمین هزینه آن سپاسگزاری می‌شود.

مکانیزم‌های احتمالی دیگر استاتینها در مهار رشد قطعات بافت اندومتر کشت داده شده در زمینه سه بعدی فیبرینی باشد.

نتیجه گیری

استاتینها داروهای رایج در درمان افزایش چربی خون می‌باشند که دارای عوارض جانبی محدودی هستند. احتمال می‌رود که تجویز استاتینها در طی دوره قاعدگی و چند روز پس از این دوره منجر به کاهش فعالیت سلول‌های اندومتر شود که از طریق خون قاعدگی وارد حفره شکمی شده‌اند. این کاهش فعالیت از طریق کاهش تکثیر سلولی و رگ‌زایی می‌باشد. مشاهدات کنونی مبنی بر تعدیل پدیده رگ‌زایی توسط مهار آنزیم reductase HMG-CoA می‌تواند به عنوان پایه و اساسی برای

References

- 1- Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett ET, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometrial stromal cell culture by interleukin-1 beta. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:269-75.
- 2- Strathy JH, Mdgaard CA, Coulam CB, Melton LJ. Endometriosis and infertility: A laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril.* 1982;38:667-72.
- 3- Kettle LM, Hummel WP. Modern medical management of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997; 24:361-73.
- 4- Adamson GD, Nelson HP. Surgical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24: 375-409.
- 5- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14:422-9.
- 6- Healy DL, Rogers PAW, Hill L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update.* 1998;4(5):736-40.
- 7- Fasciani A, Bocci G, Xu J, Bielecki R, Greenblatt E, Leyland N, Casper R C. Three-dimensional in vitro culture of endometrial explants mimics the early stage of endometriosis. *Fertil Steril.* 2003;80(5):1137-43.
- 8- Khazaei M, Esfandiari N, Javed M, Gotlieb L, Casper RC. Successful of human secretory phase endometrium culture as an In vitro model for endometriosis. *Fertil Steril.* 2004;82(2):S164.
- 9- Khazaei M, Esfandiari N, Gotlieb L, Casper RC. Angiogenesis following three-dimensional culture of isolated human endometrial stroma cells. *Fertil Steril.* 2004; 82 (2): S61.
- 10- Lea AP, Mc Tavish D. Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidemias. *Drugs.* 1997;35(5):828-47.
- 11- Graaf MR. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol.* 2004;22(12):2388-94.
- 12- Ruiz-Velasco. Statins upregulate CD 36 expressin in human monocytes an affect strengthened when combined with PPAR-gamma ligand putative contribution of Rho GTPase in statin-induced CD36 expression. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(2):303-13.
- 13- Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 58(11): L719-31.
- 14- Esfandiari N, Khazaei M, Ai j, Bielecki R, Gotlieb L, Ryan E, Casper R. Effect of statin on an in vitro model of endometriosis. *Fertil Steril.* 2006;87(2):257-62.
- 15- Wierzbicki AS. Atorvastatin. *Expert Opin Pharmacother.* 2001;2(5):819-30.
- 16- Malinowski JM.: Atorvastatin: a hydroxylmethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitorpor. *Am J Health Syst Pharm.* 1998;55(21):2253-67.

- 17- Vincent L, Chen W, Hong L. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett.* 2001;495:159-66.
- 18- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6:1004-10.
- 19- Weis M, Heeschen C, Glassford A, Cooke J. Statins have Biphasic effects on angiogenesis. *Circulation.* 2002;105:739-46.
- 20- Rorowski A, Walsh K. Statin therapy and angiogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(6):599-603.
- 21- Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coron Artery Dis.* 2004;15(5):235-242.
- 22- Littman BA, Smotrich DB, Stillman RJ. Endometriosis; Principal and practice of endocrinology and metabolism, 2nd Edn. Philadelphia JB. Lippincott Company. 1995;906-9.