مطالعه فراساختار سلولهای پوششی لوله رحم و رحم انسان در شرایط کشت یکسان

دکترمحمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد*- دکترمجتبی رضازاده ولوجردی- دکترسعید کاظمی آشتیانی***- دکترپوپک افتخاری یزدی*****

* استادیار گروه جنین‌شناسی(علوم تشریحی)، پژوهشکده رویان، بخش تحقیقات و دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
** استاد گروه جنین‌شناسی(علوم تشریحی)، پژوهشکده رویان، بخش تحقیقات و دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
*** استادیار گروه جنین‌شناسی(علوم تشریحی)، پژوهشکده رویان، بخش تحقیقات

تاریخ دریافت مقاله: ۸٤/٤/٤

تاریخ پذیرش: ۸٤/۹/۲۷

چکیده

مقدمه: ماده خارج سلولی به عنوان بخش مهم ریز محیط(Microenvironment)، نقش اساسی در نگهداری وضعیت تمایز دارد. در بررسی‌های گذشته، این اثر در برخی سلول‌ها از جمله سلول‌های پوششی لوله رحم و یا رحم مطالعه شده است. در این پژوهش‌ها، برای حفظ تمایز سلول ، علاوه بر ماده خارج سلولی عوامل دیگری مانند هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و سلول‌های داربستی نیز بکار رفته است ولی فراساختار سلول‌های کشت داده‌شده بویژه سلول‌های لوله رحمی کمترمورد توجه بوده است.

هدف: کشت سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم انسان بر روی ژل(ECM(Extra Cellular Matrix در ریز محیط یکسان و بررسی فرا ساختار سلول ها درشرایط کشت.

مواد و روش‌ها: بافت‌های لوله رحم و اندومتریوم انسان با مراجعه به بیمارستان‌های ا مام خمینی و روئین‌تن آرش، تهیه شد. سلول‌های پوششی را از بافت جدا کرده و بر سطح پلاستیکی ظروف معمولی‌کشت داده شد و ماهیت‌پوششی آنها به روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. سلول‌های پوششی با استفاده از تریپسین، از ظروف کشت جدا و بر روی ژل ECM کشت داده شد و در پایان فراساختار سلولی با میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شد.

نتایج: سلول‌های کنترل (سلول‌های کشت داده شده بر سطح پلاستیک) متمایز نشده و در مقاطع میکروسکوپی به شکل دوکی و کشیده پدیدار شدند. در گروه ژل ECM ، سلول های پوششی به شکل استوانه‌ای با هسته قاعده‌ای و میکروویلی در سطح رشد کردندکه از لحاظ فراساختار شباهت زیادی به سلول‌های بافتی داشتند. همچنین بررسی ها نشان داد که دو نوع سلول پوششی لوله رحم و رحم ، در کشت بر ژل ، ویژگی‌های فراساختاری مشابه دارند و اختلاف عمده آنها (یعنی وجود مژک در سطح سلول لوله رحمی)در شرایط کشت دیده نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ژل ECM بتنهایی، توانایی حفظ تمایز را داشته باشد و نیز کشت دوسلول مختلف در شرایط یکسان، اختلاف فراساختار را به کمترین میزان برساند.

کلید واژه‌ها: سلول‌های اپیتلیوم/ ماتریس برون سلولی

مقدمه

محیط اطراف سلول موسوم به ریزمحیط (microenvironment) ، نقشی کلیدی در حفظ وضعیت تمایز و بیان ژنی دارد (۱). یکی از اجزای بسیار مهم این محیط، ماده خارج سلولی (Extra cellular matrix) است. این ماده شبکه سازمان یافته‌ای از گلیکوپروتئین وپروتئوگلیکان‌ها بوده و جایگاه‌هایی برای اتصال سلول دارد (۲). ماده خارج سلولی معمولاً دور تا دور سلول را احاطه می‌کند ولی در سلول‌های پوششی تنها در مجاورت یک سطح سلول قرار دارد(غشاء پایه). مطالعات نشان داده‌است که ماده خارج سلولی در مرحله دو سلولی جنین پستانداران ظاهر می‌شود و رفته رفته بخشی از محیط خارج سلولی را تشکیل می‌دهد. ترکیب و ارتباط فضایی اجزای تشکیل‌دهنده آن در اطراف سلول‌های مختلف، متفاوت و برای هرسلول منحصر به فرد است(۳). درسال ۱۹۸٦، Kleinman وهمکاران ، ماده خارج سلولی را از سارکومای موش EHS (Engelbreth Holm-swarm) استخراج کردند و با افزودن کلاژن نوع IV وپروتئوگلیکان هپاران سولفات، ژل ماده خارج سلولی (ECM gel) تهیه کردند(٤). شرکت‌های تجاری از جمله سیگما، با ضدعفونی کردن این ژل، آن را به صورت آماده در اختیار محققان قرار دادند. پس از آن تحقیقات گسترده‌ای در مورد تاثیر آن برکشت سلول‌های مختلف انجام شد. در

سال ۱۹۸۷، Emonard و همکاران سلول‌های فیبروبلاستی پوست گاو را بر روی ژل ECM کشت داده و تعامل بین آن دو را مورد مطالعه قرار دادند. ٦ ساعت پس از کشت، فیبروبلاست‌ها به داخل ژل مهاجرت کرده و با تکثیر خود، شبکه سلولی بوجود آوردند و پس از ۳ روز، فیبرونکتین و رشته کلاژن ترشح کردند(۵).

مطالعات پیشین نشان داده‌است که حضور ماده خارج سلولی در محیط کشت سلول‌های پوششی سبب تمایز مورفولوژی می‌شود، به‌طوری‌که با کشت سلول‌های پوششی پستانی بر روی ماده خارج سلولی، این سلول‌ها فنوتیپ قطبی یافته و پروتئین‌های شیر در محیط کشت ترشح می‌شود(۸-٦). همچنین با کشت سلول‌های تیروئیدی بر روی ژل کلاژن ساختاری شبیه فولیکول‌های تیروئیدی بوجود می آید(۹). همچنین نقش ژل ECM در تمایز مورفولوژی سلول‌های اپی‌دیدیم(۱۰)، سلول‌های اندوتلیال گلومرولی(۱۱)، دیواره سلول گرانولوزا(۱۲)، سلول‌های پوششی نای(۱۳) وغدد بزاقی(١٤) نشان داده‌شده است.

استفاده از ژل ECM برای کشت سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم انسان همواره مورد توجه محققان بوده است. هدف عمدتاً بررسی اهمیت و نقش این سلول‌ها در فرآیندهای تولید مثلی است. برخی محققان با کشت و تمایز سلول‌های پوششی رحم بر روی ژل ECM فرآیند کاشت جنین را مورد مطالعه قرار دادند(۱۷-۱۵). برخی دیگرتوانستند با تمایز سلول‌های پوششی لوله رحم و ایجاد سیستم هم‌کشتی با اسپرم، توان حرکتی و قدرت آمیزشی اسپرم رابه‌مدت نسبتاً طولانی حفظ کنند(۲۰-۱۸). ما در مطالعه‌ای، از سیستم هم‌کشتی جنین با سلول‌های پوششی رحم کشت یافته بر سطح ژل ECM، برای بهبود تکوین جنین استفاده کردیم(۲۱). البته برای مطالعه فرآیندهای عمومی نظیر فیزیولوژی و تنظیم تمایز سلول پوششی نیز از سلول‌های پوششی رحم و لوله رحم کشت شده بر روی ژل ECM استفاده شده است(۲۹-۲۲). در بررسی‌های مذکور علاوه بر ژل ماده خارج سلولی، فاکتورهای رشد، عوامل هورمونی، سلولی و مواد القاکننده تمایز نظیر اسیدرتینوئیک برای حفظ وضعیت تمایز یافتگی سلول بکار گرفته شده است. یکی از جنبه‌های مهم تمایز مورفولوژی، تمایز فراساختاری‌ست که در این زمینه اطلاعات موجود بسیار اندک است و فقط گزارش‌های معدودی در مورد فراساختار سلول‌های پوششی رحم انسان وجود دارد و البته برای کشت سلول علاوه بر ژل ECM از عوامل هورمونی و سلولی نیز استفاده شده‌است(١٦-١٥و٢٩-٢٨). در تحقیق ما، سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم انسانی در شرایط مشابه، بر روی ژل ECM و با استفاده از محیط DMEM/ HAM´S F12(بدون عوامل هورمونی و سلولی) کشت شده و فرا ساختار دو سلول در شرایط یکسان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

۱-تهیه نمونه و جداسازی سلول: نمونه های لوله رحم ورحم انسانی با رضایت آنها از ۱۵ بیمار هیسترکتومی زیر ۳۰ ساله در بیمارستان‌های روئین تن آرش و امام خمینی تهران تهیه شد. بخشی از آنها برای مطالعه فراساختار وبخشی دیگر به کشت اختصاص داده‌شدند. برای جداسازی سلول‌های پوششی لوله رحم روش Dickens(1993)و همکاران بکار رفت(۳۱). بدین ترتیب که مخاط از لوله رحم جدا شد و به قطعات یک سانتیمتری تقسیم و به مدت ۱/۵ ساعت در آنزیم تریپسین ۰/۵٪ نوع I(Sigma,USA) در دمای اتاق انکوبه شد. محصول هضم آنزیمی، با شتاب g ۲۵۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب آن در ۳ میلی لیتر محیط DMEM/HAM´S F12 Dulbecco´s modified Eagle Medium/HAM´S F12, sigma;USA به حالت معلق نگه‌داشته شد. سلول‌های پوششی رحم بر اساس روش classen-Linke و همکاران (با اندکی تغییر) جدا شد(۲۸). به‌طورخلاصه ابتدا اندومتریوم به قطعات۰/۵ تا ۱ سانتیمتری بریده شد و به داخل لوله‌های محتوی آنزیم کلاژناز نوعI (sigma;USA) منتقل و سپس ۱/۵ ساعت

در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده‌شد. آنگاه سلول‌های پوششی با روش Sedimentation از بافت هضم نشده اندومتریومی جدا شده و درداخل محیط DMEM/HAM´S F12 محتوی ۱۰٪ سرم (Fetal calf serum, Gibco; UK) به حالت معلق در آورده‌شد. سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم انسان، با غلظت ۶×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر در بشقاب‌های ۲٤ خانه‌ای(Falcon; USA) کشت داده شدند. پنج روز پس از آغاز کشت اولیه، ماهیت پوششی سلول‌ها با روش ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.در مرحله بعدسلول‌های پوششی بااستفاده ازTtypsin/EDTA (Gibco ;UK) جدا شده و بر روی ژلECM وسطح پلاستیک ظروف کشت معمولی به عنوان کنترل کشت داده شدند.

۲- ایمونوسیتوشیمی: برای نشان دادن سایتوکراتین ۷ در سیتوپلاسم سلول‌های پوششی از سیستم پراکسیداز Dako Envision system (Dako, Denmark) استفاده شد. ابتدا، پراکسیداز داخلی سلول‌ها، با استفاده از محلول Peroxidase block به مدت ۵ دقیقه خنثی شد. سپس تک لایه سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در معرض آنتی‌سایتوکراتین ۷ قرار گرفت. آنگاه آنتی‌بادی ثانویه متصل شده به Peroxidase Labeled Ploymere به مدت ۱۵ دقیقه بکار رفت و در پایان استفاده از محلول -DAB^{+}substrate chromogen به مدت۱۰ دقیقه باعث شد تا رسوب قهوه‌ای رنگی در سیتوپلاسم سلول پدیدار شود. هسته سلول‌ها با هماتوکسیلین رنگ شد(شکل۱: a و b).

از بافت اندومتریوم به عنوان کنترل مثبت استفاده‌شد(شکل ۱d: وc). برای کنترل منفی، تک لایه‌های کشت داده شده، تمام‌مراحل رنگ‌آمیزی راهمانندگروه مطالعه طی‌کردند، با این تفاوت که آنتی‌سایتوکراتین۷ بکارنرفت(شکل ۱:e وf).

۳- کشت بر روی ژل ECM: یک روز قبل از انجام کشت، لایه نازکی از ژلECM روی فیلتر اینسرت (Millicell culture plate Insert, Sigma, USA) با اندازه منافذ ۰/٤ میکرومتر و قطر ۱۲ میلی‌متر، گسترده و در معرض هوای استریل خشک شد. در زمان کشت، فیلتر اینسرت پوشیده شده با ژل ECM، داخل پلیت ۲٤ خانه‌ای محتوی ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت قرار گرفت و ۰/۱ میلی لیتر محیط حاوی ۶×۱۰^{۵} سلول درهر میلی لیتر، به آن افزوده شده، در ۳۷ درجه سانتیگراد ودر Co_2 پنج درصد انکوبه شد. محیط مصرفیDMEM/HAM´S F12 حاوی ۵٪ سرم FCS بود. هر ٤۸ ساعت یکبار محیط سلول‌ها عوض شد. ۷ روز پس از آغاز کشت، سلول‌های پوششی برای مطالعه فراساختاری آماده شدند.

٤- میکروسکوپ الکترونی گذاره: ابتدا سلول‌های کشت داده‌شده، بافت آندومتریوم و مخاط لوله رحم به مدت ۱ ساعت با محلول کارنوفسکی ثابت شدند وپس از آن، با بافرفسفات سورنسون شسته شده و با محلول اسمیوم (Sigma, USA) ثبوت ثانویه انجام شد (۱ ساعت). آنگاه سلول‌ها و بافت، بترتیب پس از آبگیری با اتانول و آغشتگی با مخلوط استون و رزین، در رزین آرالدیت ۲۰۰۵(Sigma, USA) قالب گرفته‌شدند و از آنها برش‌های۳۰۰ و۷۰ نانومتری تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو (برش‌های ۳۰۰ نانومتری) و استات اورانیل و سیترات سرب (برش‌های ۷۰ نانومتری) زیر میکروسکوپ الکترونی(Ziess TM 900, Germany) بررسی شدند.

نتایج

۱- کشت سلول: یک روز پس از آغاز کشت بر روی ژل ECM، سلول‌های پوششی تکثیر یافته و جزایر کوچک سلولی تشکیل شدند. در مدت ۷ روز رفته رفته فاصله‌های بین این جزایر سلولی پر شدند. سلول‌های کشت داده شده بر روی ژل ECM کاملا متراکم بود و فاصله‌ای بین سلول‌ها دیده نشد، در حالی‌که سلول‌های کشت داده شده بر روی سطح ظروف کشت (پلاستیک) از همدیگر فاصله داشتند.

شکل۱ :(a)سلول‌های پوششی لوله رحم و(b) رحم انسان در محیط کشت. سایتوکراتین ۷ در سیتوپلاسم سلول با رنگ آمیزی آنتی‌ایمونوسیتو شیمی قهوه‌ای رنگ شده است. (c) و(d)بافت غددی اندومتریوم انسان به عنوان کنترل مثبت.(e) و(f)کنترل منفی(سلول‌های پوششی که مراحل رنگ‌آمیزی را بدون استفاده ازآنتی بادی طی کرده‌اند).

۲-ایمونوسیتوشیمی: نتایج رنگ‌آمیزی نشان داد که بیش از ۹۰٪ سلول‌های کشت شده سایتوکراتین مثبت هستند

۳- فراساختار سلول‌های لوله رحمی: در مقاطع تهیه شده از بافت لوله رحم، دو نوع سلول پوششی تیره و روشن دیده می‌شد(شکل a:۲). سطح آزاد سلول‌های روشن، میکروویلی داشت و همان سطح در سلول‌های تیره، مژک‌دار بود. در زیر پوشش هسته سلول‌ها، لایه هتروکروماتینی وجود داشت و بخش مرکزی هسته عمدتا یوکروماتین بامناطق پراکنده‌هتروکروماتینی بود(شکل۳ :a). سلـــول‌های فـوق به شکل تک‌لایه استـــوانـه‌ای بر روی داربستی از بافت هم بند قرار گرفته بودند(شکل ۲ :a). بین دو سلول مجاور در بخش بالایی غشای جانبی، اتصال محکم و دسموزوم و در زیر غشای قاعده‌ای سلول‌ها، غشای پایه وجود داشت. در مجاورت بخش قاعده‌ای سلول‌های استوانه‌ای، سلول‌های کوچک و نسبتا کروی شکل‌دیده‌می‌شد. این‌سلول‌ها تیره‌رنگ بودند و سطح‌رأسی آن به بیرون باز نمی شد(شکل ۳ : a). هسته این سلول‌ها بزرگ و بیضی شکل و سیتوپلاسم آنها به شکل‌نواربار‌یکی دراطراف‌هسته خودنمایی می‌کرد. در سیتوپلاسم‌سلول‌های تیره وروشن، تعداد زیادی میتوکندری وrER دیده می‌شد.

شکل۲: (a) مخاط لوله رحم و(b) اندومتریوم انسان. (c) سلول‌های پوششی لوله رحم و(d) رحم کشت یافته بر روی ژل ماده خارج سلولی.(e) سلول‌های پوششی لوله رحم و(f) رحم کشت یافته بر روی سطح پلاستیک ظروف معمولی کشت(مقاطع نیمه نازک، رنگ آمیزی تولوییدن بلو، درشت نمایی ۱۰۰۰ X).

در مقاطع سلول‌های کشت یافته بر روی ژل، دو نوع سلول تیره و روشن تا حدودی از هم قابل تمیز بودند ولی سلول مژک‌دار دیده‌نمی‌شد. این سلول‌ها، به شکل تک‌لایه بر زمینه‌ای از ژل ECM تکیه کرده بودند(شکل ۲ :c). بین سلول‌های استوانه‌ای اتصال محکم برقرار شده‌بود(شکل ۳: c). هسته سلول‌ها تقریباً کروی‌بودند وکروماتین یکنواختی داشتند و همچنین لایه‌ای از غشای پایه در زیر آنها قرار داشت (شکل۳: g). در سلول‌های کشت یافته، سلول کوچک کروی دیده نشد. در سیتوپلاسم و در بالای هسته تعداد زیادی میتوکندری با کریستای کاملا واضح قرار داشتند و علاوه برآن، rER نیز مشاهده می‌شد. سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک(ظروف کشت معمولی) تمایز نیافته‌بودند و در مقاطع میکروسکوپی به شکل لایه‌ای ازسلول‌های دوکی وکشیده ظاهرشدند(شکل ۲: e).

٤- فراساختار سلول‌های رحمی:در مقاطع میکروسکوپی، سلول‌های پوششی بافت رحم به شکل تک لایه‌ای از سلول‌های استوانه‌ای با میکروویلی در سطح ظاهر شدند(شکل۲:b). هسته بیضی شکل سلول‌ها، یوکروماتین با مناطق پراکنده هتروکروماتین بود(شکل۳ :b). زیر سلول‌های پوششی، بافت پیوندی متشکل از سلول‌های فیبروبلاست(داربستی) و عروق خونی دیده می‌شد. سلول‌های پوششی روی غشاء پایه قرار داشتند و بین دو سلول مجاور در بخش فوقانی غشاهای جانبی، کمپلکس اتصالی برقرار شده بود. پایین‌تر ازاین اتصال‌ها، غشای سلول به صورت عمود تا غشاء پایه امتداد یافته و interdigitation در بین سلول‌ها وجود نداشت. سیتوپلاسم سلول‌های پوششی حاوی مخازن rER، کمپلکس گلژی و تعدادی میتوکندری بود.

شکل ۳:(a)سلول پوششی لوله رحم و(b)رحم انسان.(c)سلول پوششی لوله رحم و(d)رحم کشت یافته بر روی ژل ماده خارج سلولی(مقاطع نازک ،رنگ آمیزی سیترات سرب و استات اورانیل، درشت نمایی ۳۰۰۰ X).(e) و(g) سلول پوششی لوله رحم و(f) و(h) رحم کشت‌یافته بر روی ژل ماده خارج سلولی(مقاطع نازک، رنگ آمیزی سیترات سرب و استات اورانیل ، درشت‌نمایی ۱۵۰۰۰ X، S : داربست، E : ژل ماده خارج سلولی، N : هسته،M : میتوکندری)

سلول‌های کشت یافته، مشابه سلول‌های پوششی بافت، به شکل تک لایه‌ای و استوانه‌ای بودند و برخلاف آن بر زمینه‌ای از ژل ECM قرار گرفته بودند(شکل۲: d). بین دو سلول مجاور اتصال محکم برقرار بود و سلول بر روی غشاء پایه قرار داشت. در غشاء جانبی سلول‌های کشت یافته و بلافاصله در زیر اتصال‌های محکم، زائده‌هایی وجود داشت که با زائده‌های مشابه سلول مجاور در هم فرو می‌رفت(شکل ۳: fوd). هسته یوکروماتین، در بخش قاعده‌ای و با فرورفتگی‌هایی در پوشش آن دیده می‌شد.

سیتوپلاسم حاوی تعداد نسبتا زیادی میتوکندری با کریستاهای واضح بود(شکل۳ : h)، این ارگانل به شکل کروی یا بیضوی در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده شده‌بود. علاوه بر آن، مخازن rER نیز در سیتوپلاسم دیده می‌شدند. سلول‌های کشت یافته بر پلاستیک(ظروف کشت معمولی) تمایز نیافته‌بودند ودر مقاطع میکروسکوپی به شکل لایه‌ای از سلول‌های دوکی شکل و کشیده ظاهر شدند(شکل ۲ : f).

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم انسان بر روی ژل ECM کشت داده‌شد. البته پیش از این نیز این کار انجام شده‌بود. در سال ۱۹۹۵ Thomas و همکاران، سلول‌های پوششی لوله رحم اسب را بر روی ژل ECM و در حضور۱۷ بتااسترادیول کشت دادند که سلول‌های کشت‌یافته ظاهری قطبی داشتند و از لحاظ مواد ترشح شده در مقایسه با سلول‌های کشت یافته بر سطح ظروف معمولی(پلاستیک) تفاوت داشتند(۲۹) در همان سال Joshi و همکاران با تمایز مورفولوژی سلول‌های پوششی لوله رحم‌گاو بر ژل ECM نشان دادند که این سلول‌ها، تحت تأثیر ۱۷ بتا استرادیول، پروتئینی با وزن مولکولی ۱۷ کیلو دالتون آزاد می‌کنند. در مطالعه ایشان سلول های پوششی کشت‌یافته، مکعبی تا استوانه‌ای شکل بودند(۲۳). در سال ۱۹۹۸ Elington و همکاران سلول‌های پوششی لوله رحم انسان و گاو را بر روی ژل ECM کشت دادند و بدون ارزیابی تمایز مورفولوژی، از آنها برای بهبودحرکت و توان آمیزشی اسپرم انسان استفاده کردند(۲۰). در مطالعه ما سلول‌های پوششی لوله رحم انسان، بدون استفاده از عوامل هورمونی مانند ۱۷ بتا استرادیول، بر ژل ECM متمایز شدند و فراساختار آنها مورد مطالعه قرار گرفت.

پیش از این، تمایز مورفولوژیک سلول‌های پوششی رحم نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌بود. در سال۱۹۹۰ Schatz و همکاران، سلول‌های پوششی رحم انسان را با بیوپسی از رحم جدا کردند و بر ژل ECM کشت دادند و در محیط کشت سلول نیز از هورمون‌های استروئیدی استفاده کردند(۲۷). همچنین در سال۱۹۹۵ Bentin-Ley و همکاران، سلول‌های پوششی و داربستی رحم انسان را در یک سیستم واحد کشت دادند(۱۶). آنها سلول‌های استرومایی را داخل ماتریکس کلاژن کشت داده و لایه‌ای از ژل ECM را بر روی آن قرار دادند. سلول‌های پوششی بر سطح این لایه ژلی کشت شد. در این مطالعه سلول‌های پوششی رحم انسان را بدون استفاده از سلول‌های داربستی و عوامل هورمونی روی ژل ECM کشت دادند و فراساختار آنها مورد مطالعه قرار گرفت. هدف دیگر مطالعه ما کشت سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم انسان در شرایط کاملا یکسان (محیط DMEM/ HAM´S F12و ژل ECM) بود تا به این ترتیب فراساختار آنها مقایسه شود. در بررسی‌های پیشین این نوع مقایسه انجام نشده بود.

ژل ECM از تومور غنی از غشای پایه موش، نژاد Engelbreth-Holm-Swarm، استخراج می‌شود و حاوی ماکرومولکول‌های انتاکتین، لامینین، کلاژن IV، پروتئوگلیکان هپاران سولفات و تعدادی فاکتور رشد نظیر bFGF, IGF, EGF,TGF و PDGF است. برخی محققان معتقدند که خاصیت القای تمایز ژل، ناشی از فاکتورهای رشد آن است(۲۸). برخلاف این گروه،(۱۹۹۰) Struli و همکاران نشان دادند که ژل ECM فاقد فاکتور رشد، تأثیرخود را در القای تمایز به سلول‌های پستانی از دست نمی‌دهد و معتقدند که عامل مؤثر ژل، ماکرومولکول لامینین است (۳۲). لامینین در محیط کشت سلول‌های پوشش پستانی، سبب قطبی شدن این سلول‌ها و القای نسخه‌برداری ژن می‌شود.

برحسب یافته‌های این مطالعه، سلول‌های پوششی در حالت تعلیق کروی شکل هستند و با کشت بر ژل، به سطح آن چسبیده، پهن و کشیده می‌شوند. سلول‌ها متاثر از القای ژل، تکثیر یافته و سطح آن را پر می‌کنند. در مدت کشت بتدریج بر طول سلول ها افزوده شده و غشای پایه در زیر سلول‌ها ظاهر می‌شود. به طوری که در پایان روز

هفتم، سلول‌ها شکل استوانه‌ای گرفته و غشای پایه در زیر آنها تشکیل شده‌است. با توجه به روش بکار رفته، بدرستی نمی‌توان گفت که از چه زمانی تراوش عناصر غشای پایه آغاز می‌شود ولی آنچه مسلم است در پایان روز هفتم(یعنی روزی‌که سلول‌ها برای میکروسکوپ الکترونی آماده شده بودند) غشای پایه به‌طور کامل تشکیل شده بود. به‌نظر می‌رسد وظایف ژل با تشکیل غشای پایه در زیر سلول به آن منتقل می‌شود. با این حال اثبات این فرضیه به انجام بررسی‌های بیشتری نیاز دارد.

مقایسه ساختار سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم بر روی ژل ECM ، تفاوت‌هایی جزیی بین آنها نشان داد. مثلا سلول‌های پوششی لوله رحمی باریک‌تر و تا حدودی بلندتر از سلول‌های رحمی بودند و بخش قاعده‌ای سلول پوششی رحم زایده‌هایی داشت که با زایده‌های سلول مجاور در هم فرو می‌رفت، در حالی که این وضعیت در سلول‌های لوله رحمی دیده نمی‌شد. با این وجود دو سلول شباهت های زیادی‌داشتند. مثلا هر دو استوانه‌ای بودند و هسته کروی تا بیضوی شکل آنها در قاعده قرار داشت. در زیر هر دو نوع سلول، غشاء پایه و بر سطح هر دو میکروویلی وجود داشت. در هر دو مورد، بین سلول‌های مجاور اتصال محکم برقرار شده بود. شاید تا حدودی بتوان این شباهت‌ها و تفاوت‌ها را با یادآوری منشاء جنینی این دو سلول توضیح داد. سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم از مجرای پارامزونفریک منشا گرفته و تکامل پیدا می‌کنند. به این ترتیب که در تکامل داخل رحمی، سلول‌های بخش‌های مختلف مجرا، با دریافت چندین القای مختلف، مسیرهای تکاملی متفاوتی را می‌پیمایند. سلول‌های بخش سفالیک مجرا، به سلول‌های لوله رحمی وسلول‌های بخش کودال به سلول‌های رحمی تمایز پیدا می‌کنند. با توجه به یافته‌های این بررسی بنظر می‌رسد که مکانیسمی مشابه، در دوران بعد از تولد ودر محیط in vitro عمل می کند. به این ترتیب که با کشت دو سلول مختلف در ریز محیط یکسان به سبب القای یکسان، ویژگی‌های فراساختاری مشابه ایجاد می‌شود. در واقع در پاسخ به ترکیب ماکرومولکولی اطراف، سلول ساختار مناسبی بدست می‌آورد. البته تفاوت‌های جزیی نیز ظاهرمی‌شود.این‌که‌چه‌مکانیسم‌هایی عمل می‌کنند و به‌رغم وجود ریزمحیط یکسان، فراساختار یکسان ایجاد نمی‌شود، ناشناخته است. شاید ژنوم سلول پس از تکامل داخل رحمی، به‌گونه‌ای تغییر می‌کند که انعطاف لازم را برای تطابق کامل با القاهای شرایط ریز محیطی محیط کشت نداشته‌باشدکه‌البته این موضوع نیاز به تحقیق بیشتری دارد. نکته جالب دیگر، وجود اختلاف آشکار فراساختاری بین سلول‌های کشت‌یافته و بافت در مقاطع میکروسکوپی بود. هسته سلول‌های کشت یافته کاملا یوکروماتین بودند، در حالی که در هسته سلول‌های بافتی، مناطق هتروکروماتین نیز به چشم می‌خورد. در سلول‌های کشت‌یافته اثری از سلول مژک‌دار دیده نشد، در حالی که این نوع سلول در بافت لوله رحمی بوفور وجود داشت. این موضوع نیز با در نظر گرفتن شرایط in vivo وin vitro تا حدودی قابل توجیه است. in vivo ، سلول‌های پوششی روی‌داربستی از سلول‌های استرومایی قرار گرفته‌اند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که بر سلول‌های استرومایی رسپتور هورمون‌های استرادیول و پروژسترون وجود دارد و در نتیجه تأثیر این هورمون‌ها با واسطه این سلول‌ها به اپی‌تلیوم رسیده تمایز و عملکرد آنها را تنظیم می‌کند(۳۳و ۳۴). البته مطالعه comer و همکاران نشان داد که هورمون‌های استروئیدی قادر به تاثیر مستقیم بر سلول‌های پوششی هستند و باعث مژک‌زایی در سطح سلول می‌شوند. این محققان با افزودن استرادیول به محیط کشت سلول‌های پوششی لوله رحم توانستند در حدود یک سوم این سلول‌ها را مژک‌دار کنند (۳۵). همچنین بر خلاف این مطالعه که هیچ مژکی بر سطح سلول مشاهده نشد، در مطالعه Bentin-Ley و همکاران(۱۶) وClassen-Linke وهمکاران(۲۸)،بکارگیری هورمون‌های استروئیدی در سطح رأسی سلول، مژک‌ها ظاهر شدند. عامل دیگردر ایجاد اختلاف فراساختاری، احتمالاً ترکیب محیط DMEM/ HAM´S F12 و تفاوت آن با مایع بافتی اطراف سلول‌های لوله رحم و رحم، در

شرایط in vivo است. شاید نبودن سلول‌های استرومایی و عوامل هورمونی در محیط کشت سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم و نیز تفاوت محیط کشت با محیط طبیعی سلول‌ها، عامل این اختلاف‌های فراساختاری بوده باشد. البته تفاوت ژل ECM وغشاء پایه طبیعی را نیز نباید از نظردورداشت. همانطورکه ذکرشد،ژل ECM ازنوعی‌تومور موشی‌استخراج می‌شود(۴) و به این ترتیب از لحاظ‌ترکیب ماکرومولکولی با غشای پایه زیر سلول‌های پوششی متفاوت‌است و درنتیجه القاهای متفاوتی نیز خواهدداشت. بنظر می‌رسد:۱- سلول‌های پوششی کشت داده شده بر ژل ECM بدون‌حضورسلول‌های‌استرومایی وعوامل هورمونی، فنوتیپ‌سلول پوششی را بدون کسب جزئیات فراساختاری سلول‌مبدأ بدست می‌آورند (مثلاً سلول‌های پوششی کشت شده مژک ندارند). به بیان دیگر، ژل به‌تنهایی قادر است شکل استوانه‌ای سلول پوششی و ظاهر قطبی آن را در کشت حفظ کند ولی احتمالا برای ایجاد سایر جزئیات فراساختاری، فراهم کردن شرایطی کاملا مشابه شرایط بدن لازم است این نکته نیاز به بررسی بیشتری دارد.

۲- تفاوت‌های فرا ساختاری دو سلول پوششی مختلف که در شرایط یکسان(DMEM/ HAM´S F12) ، بر ژل کشت داده‌شده باشند، کاهش می‌یابد و دو نوع سلول از لحاظ ساختار ویژگی‌های مشابهی کسب می‌کنند.

تشکرو قدردانی: این تحقیق بخشی از طرح‌های تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان است.

نویسندگان مراتب تشکر خود را ازمساعدت های صمیمانه مسئولان محترم پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند. همچنین ازکارکنان محترم اتاق عمل بیمارستان‌های امام خمینی و رویین‌تن آرش تهران برای تهیه نمونه‌های لوله رحم و اندومتریوم انسانی و نیز از کارشناسان و کادر علمی بخش میکروسکوپ الکترونی دانشگاه شهید بهشتی به‌ویژه جناب آقای پیریایی بخاطر برش‌گیری و تهیه عکس از نمونه‌ها سپاسگزاری می‌کنیم.

منابع

1. Blau HM, Blatimore D. Differentiation Requires Continuons Regulation. J Cell Biol 1991; 112: 781-783.

2. Hay ED. Cell Biology of Extra Cellular Matrix. New york; Plenum Pre s 1981.

3. Adams JC, Watt FM. Regulation of Development and Differentiation by the Extracellular Matrix. Dev 1993; 117:1183-1198.

4. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Connon FB, et al. Basement Membrane Complexes with Biological Activity. Biochem 1986; 25: 312-8.

5. Emonard H, Calle A, Grimaud JA, Peyrol S, Castronovo V, et al.Interactions between Fibroblasts and a Reconstituted Basement Membrane Matrix. J Invest Dermatol 1987; 89: 156-163.

6. Hall HG, Farson DA, Bissell MJ. Lumen Formation by Epithelial Cell Lines in Response to Collagen Overlay: a Morphogenetic Model in Culture. Proc Natl Acad Sci USA1982; 79: 4672-4676.

7.Lee EY- H P, Lee W-H, Kaetzel CS, Parry G, Bissell MJ. Interaction of Mouse Mammary Epithelial Cells with Collagen Substrata: Regulation of Casein Gene Expression and Secretion. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 1419-1423.

8. Parry G, Cullen B, Kaetzel CS, Kramer R, Moss L. Regulation of Differentiation and Polarized secretion in mammary Epithelial Cells Maintained Culture: Extracellular Matrix and Membrane Polarity Influences.J cell Biol 1987;105:2043-2051.

9. Chambard M, Cambion J, Manchamps J. Influence of Collagen Gel on the Orientation of Epithelial Cell Polarity, Follicle Formation from Isolated Thyroid Cells and from Preformed Monolayers. J cell Biol 1981; 91: 157.

10. Byers SW, Hadley MA, Djakiew D, Dym M. Growth and Characterization of Polarized Monolayers of Epididymal Epithelial Cells and Sertoli Cells in Dual Environment Culture Chambers. J Androl 1986; 7: 59- 68

11. Tsuchida S. Hiraoka M, Tsukahara H, Negami AL, Tominaga T, Sudo M. Morphological Characterization of Glomerular Endothelial Cells Cultured on a Basement Membrane Matrix. Nippon Jinzo Gakkai Shi 1994; 36:1-8.

12. Hwang DH, Kee SH , Kim K, Cheong KS, Yoo YB, Lee BL. Role of Reconstituted Basement Membrane in Human Granulosa Cell Culture. Endocr 2000; 47:177- 183.

13.Benali R, Dupuit f, Jaqut j, Fucfiey C,

Hinnrasky j,et al. Growth and Characterization of Isolated Bovine Tracheal Gland cell in Culture: Influence of a Reconstituted Basement Membrane Matrix. Biol Cell 1999; 66: 263.

14. Hosokawa Y, Takahashi Y, Kadoya Yama Shina S, Nomizu M, Yamada Y , Nogawa H. Significant Role of Laminin-1 in Branching Morphogenesis of Mouse Salivary Epithelium Cultured in Basement Membranc Matrix. Dev Growth Diff 1999; 41: 207- 216.

15. Bentin- Ley U, Horn T, Sjogren A, Sorensen S, Falck Larsen J, et al. Ultrastracture of Human Blastocyst- Endometrial Interactions in Vitro. J Reprod Fertil 2000; 120:337- 350.

16. Bentin- Ley U, Lindenberg S, Horn T, Larsen JF. Ultrastructure of Human Endometrial Cells in a Three- Dimentional Cell Culture System for Human Implantation Studies. J Assist Reprod Genet 1995; 12:632-638 .

17. Bentin- Ley U, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. Presence of Uterine Pinopodes at the Embryo- Endometrial Interface During Human Implantation in Vtro. Hum Reprod 1999; 14:515- 520.

18. Pollara JW, plante C, king WT, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. Fertilizing Capacity of Bovine Sperm May be Maintained by Binding of Oviductal Epithelial cells. Biol Reprod 1991; 44:102-107.

19. Sidhu KS, Mate KE, Redger JC. Sperm-Oviduct Epithelial cell Monolayer co- Culture:an in Vitro Model of Sperm- Female Tract Interactions in a Marsupial, the Tammer Wallaby (Macropus Engenii) . J Reprod Fertil 1998; 114: 55- 61.

20. Ellington JE, Jones AE, Davitt CM, Schneider CS, Brishois RS, et al. Human Sperm Function in co- Culture with Human, Macaqne or Borine oviduct Epithelial Cell Monolayers. Hum Reprod 1998; 13: 2797-2864.

21. Eslami- Nejad MRB, Valojerdi MR, Ashtiani SK. A Comparison of Polarized and Non- Polarized Human Endometrial Monolayer Culture Systems on Murine Embryo Development. J EXP Clin Assist Reprod 2005; 2: 7.

22. Woldesenbet S, Newton GR. Comparison of Proteins Synthesized by Polarized Capoine Oviductal Cells and Oviductal Explants in Vitro. Theriogenology 2003; 60:533- 543.

23. Joshi MS. Growth and differentiation of the Cultured Secretory Cells f the Cow Oviduct on Reconstitued basement membrane. J EXP Zool 1991; 260:229- 238.

24. Mahfondi A, Nicollier M, Propper AY, Coumes-Marquet S, Adessi GL. Establishment of Endometrial Glandular Epithelial Cell Subculture in a Serum- Free Hormonally Defined Medium, on a Basement Membrane Matrix. Biol cell 1991;71: 255-265.

25. Arnold JT, Kanfman DJ, Seppala M, Lessey BA. Endomenttial Stromal Cells Regulate Epithelial Cell Growth in Vitro: A New Co- Culture Model. Hum Reprod 2001; 16:836- 845.

26. Park DW, choi DS, Ryn HS, Kwon HC, Joe H, Min Ck. A Well- Defined in Vitro Three-Dimensional Culture of Human Endometrium and Its Applicability to Endometrial Cancer invasion . Cancer Lett 2003; 195:185- 192.

27. Schatz F, Gordon RE, Laufer N, Gurpide E. Culture of Human Endometrial Cells Under Polarizing Conditions. Differentiation 1990; 42:184- 190.

28. Classen- Linke I, Knsche M, Knauthe R, Beier HM. Establishment of a Human Endometrial Cell Culture System and Characterization of Its Polarized Hormon Responsive Epithelial Cells. Cell Tissne Res 1997; 287:171- 185.

۲۹- باغبان اسلامی‌نژاد، محمدرضا؛ رضازاده، مجتبی؛ کاظمی، سعیـد: فراساختار سلول های اپیتلیال رحم انسانی کشت یافته روی ماتریکس برون سلولی و پلاستیک. مجله یاخته، ۱۳۸۲، سال پنجم شماره ۱۹ ، صص:۱۵۳-۱۴۵ .

30. Thomas PG, Ignotz GG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Currie B. Isolation, Culture and Characterization of Equine Epithelial Cells in Vitro. Mol Reprod Dev 1995; 41:468- 478.

31. Dickens CJ, Southagte J, Leese JJ. Use of Primary Culture of Rabbit Oriduct Epithelial Cells to Study of the Ionic Basis of Tubal Fluid Formation. J Reprod Fertil 1993; 98:603- 610.

32. Steruli CH, Bissel MJ. Expression of Extracellular Matrix Components is Regulated by Substratum. J Cell Biol 1990; 110:1405-1415.

33. Kurita T, Young P, Brody JR, et al. Stromal Progestrone Receptors Mdiate the Inhibitory Effects of Progestrone on Estrogen- Induced Uterine Epithelial Cell Deoxyribonucleic Acid Synthesis. Endocrin 1998; 139:4708-4713.

34. Cooke PS, Buchanan DL, Young P, et al. Stromal Estrogen Receptors Mediate Mitogenic Effects of Estradiol on Uterine Epithelium. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:6535- 6540.

35.Comer MT,Leese HJ,Southgate J. Induction of a Differentiated Ciliated Cell Phenotype in Primary Culture of Follopian tube Epithelium. Hum Reprod 1998;13:3114-3120.

Ultra Structure of Human Uterine and Oviduct Epithelial Cells Cultivated Under the Same Culture Condition

Baghaban Eslami Nezhad M.R.(Ph.D), Rezazadeh Valojerdi M. (Ph.D), Ashtiani, S.K. (Ph.D),

Eftekhar Yazdi,P(Ph.D).

Abstract

Introduction: Extra cellular matrix (ECM) as an important component of cellular microenvironment has a key role in maintaining the differentiated state of cells. Effects of ECM on morphologic differentiation of epithelial cells including those from uterus and oviduct has been shown in past studies in which cellular and hormonal factors have been used in addition to ECM to maintain epithelial cell differentiation. Not much attention has been paid, in these studies; about the ultra structure of cultured cells specially those from oviduct.

Objective: The purpose of present study is to cultivate the human uterine and oviduct epithelial cells under the same microenvironment (ECM Gel and DMEM/Ham's F12 medium) and to observe and compare ultra structural characteristics of the cultured cells by transmission electron microscopy (TEM).

Materials and Methods: For this purpose, uterine and oviduct tissue were obtained from patients undergoing total hysterectomy in Emam Khomeini Hospital. Epithelial cells, after being isolated, were cultured on plastic surfaces and the epithelial nature of the cells was confirmed using immunocytochemistry. Cells with epithelial nature were trypsinized and cultured on ECM gel. At the end ultra structure of cells in parallel with tissue were prepared for TEM.

Results: Our results showed that the plastic cultured cells have no signs of differentiation and appeared as elongated spindle cell in sections, whereas those cultured on ECM gel had highly differentiated structure and observed as columnar in shape. In this term they were very similar to epithelial cells from tissue fragment. Epithelial cells of oviduct, cultured on ECM gel, were noticed ultra structurally very similar to that from uterus. The main structural difference existed in vivo state (the presence of abundance cilia on apical surface of oviduct epithelial cells) were not observed in vitro.

Conclusion: As a conclusion, it seems that ECM gel by itself is enough to induce morphologic differentiation and structural polarization of epithelial cells.Uultra structurally different cells grows and acquires the same structure when being cultured under the same microenvironment.

Key words: Epithelial cells/ Exracellular matrix