

## بررسی فراساختار سلولهای اینترستیشیال کاخال در بیماری هیرشپرونک

نغمه احمدیان کیا M.Sc.\*، یوسف صادقی M.D., Ph.D.\*

محمد بیات Ph.D.\*، حسین حقیر M.D., Ph.D.\*

\*دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

‡ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۷۱۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

### چکیده

دریافت مقاله: ۸۱/۵/۲۸، پذیرش مقاله: ۸۲/۸/۱۰

‡ **هدف:** بررسی موقعیت آناتومیک و فراساختار (Interstitial Cells of Cajal: ICC) در کولون بیماران مبتلا به بیماری هیرشپرونک Hirschprung's Disease

‡ **مواد و روشها:** نمونه‌ها از قسمت‌های سالم و بیمار کولون ۱۰ کودک زیر ۱۰ سال که تحت عمل جراحی جهت درمان بیماری هیرشپرونک قرار گرفته و قسمت دیستال کولون آنها برداشته شده بود تهیه شد. با آماده سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی برشهای خیلی نازک تهیه گردید. سپس موقعیت و مورفولوژی ICC در قسمت مبتلا با قسمت سالم مقایسه شد.

‡ **یافته‌ها:** در قسمت مبتلا، ICC در موقعیت بینایی بین Smooth Muscle Cells و انتهای عصبی مشاهده نشد، در حالی که فراساختار آنها در قسمت مبتلا با قسمت سالم تفاوت عمده‌ای نداشت.

‡ **نتیجه‌گیری:** فقدان ICC در موقعیت بینایی در قسمتهای مبتلا با توجه به نقش مهمی آنها در عملکرد لایه عضلانی لوله گوارش می‌تواند توجه‌کننده وجود اسپاسم در قسمت مبتلا باشد.

**کل واژگان:** سلولهای اینترستیشیال کاخال، بیماری هیرشپرونک، سیستم عصبی روده

## مقدمه

اختلالات حرکتی لوله گوارش شایع هستند و به دلیل اطلاعات محدود از فیزیوپاتولوژی و اتیولوژی آنها درمان علتی آنها تقریباً مقدور نیست و درمانهای علامتی با هزینه‌های بالا تنها گزینه موجود برای این بیماران است (۱). بیماری هیرشپرونک (Hirschprung's Disease; HD) یکی از این نوع اختلالات است که در آن گانگلیون‌های سیستم عصبی روده (سیستم مہاری) در قسمت مبتلای کولون وجود ندارد و همین امر سبب ایجاد اسپاسم شدید در این ناحیه از کولون شده و انتقال مواد دچار اختلال می‌گردد. گفته می‌شود تعداد سلولهای اینترستیشیال کاخال نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد (۲). سلولهای اینترستیشیال کاخال (Interstitial Cells of Cajal; ICC) اولین بار توسط Ramon y Cajal تحت عنوان سلولهای عصبی اولیه در اعضای که (بویژه روده) بوسیله سیستم عصبی خودکار (Autonomic Nervous System; ANS) عصب‌گیری می‌شوند معرفی شد. مطالعات بعدی نشان داد که ICC نه نورون است و نه نوروگلی. امروز ICC را به عنوان نوع خاصی از سلولهای ایسترسیشیال در جدار لوله گوارش معرفی می‌کنند که به لحاظ ویژگیهای فراساختاری شباهت‌هایی با سلولهای عضلانی دارند و بیشترین تراکم آنها مجاور شبکه‌های عصبی مشاهده می‌شود (۳، ۴) و به نظر می‌رسد نقش مهمی در کنترل حرکات روده ایفا می‌کنند (۵). نقش واقعی این سلولها هنوز دقیقاً مشخص نیست اما شواهدی مبنی بر عملکرد ICC بعنوان ضریبان سازهای لوله گوارش و حد واسطه‌های مہاری بین سیستم عصبی روده‌ای و سلولهای عضلانی صاف مطرح گردیده است (۶، ۷).

با مشاهده موارد فوق، سلولهای اینترستیشیال کاخال ممکن است در پاتوفیزیولوژی اختلالات حرکتی روده‌ای نقش داشته باشند. در همین خصوص اختلال در توزیع این سلولها در تنگی هیپرتروفی شده دریچه پیلور معده نوزادان (۸)، شبه انسداد نامعلوم مزمن روده (۹) و بیماری هیرشپرونک (۱۰) بررسی شده است.

از آنجا که مشاهده و شناسایی سلولهای اینترستیشیال کاخال به وسیله میکروسکوپ نوری با مشکلاتی همراه است محققان برای مطالعه این سلولها از روشهای ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپی الکترونی استفاده می‌کنند. مرور بر مطالعات انجام شده نشان داد که در سالهای اخیر در کشورهای مختلف تحقیقاتی از زوایای مختلف روی سلولهای اینترستیشیال کاخال در بیماری هیرشپرونک بوسیله میکروسکوپ الکترونی انجام شده است که از جمله می‌توان به تحقیقات زیر اشاره نمود:

Vanderwinden و همکاران فراساختار سلولهای اینترستیشیال کاخال را در کولون مبتلا و سالم یک بیمار بررسی کردند (۲). آنها در قسمت مبتلا دسته‌های ICC کوچک را در زیر مخاط و در مجاورت داخلی‌ترین سلولهای عضلانی صاف مشاهده کردند که دارای فیلامنتهای بینابینی بودند ولی فیلامنتهای ضخیم مشاهده نشد. سلولهای اینترستیشیال کاخال دارای تیفه پایه (Basal Lamina) کامل و کاوئولهای (Caveolae) اندکی بودند.

Watanabe و همکاران سلولهای دوکی شکل PGP9.5 مثبت را

در ایلئوم بدون گانگلیون در نوع خاصی از موشهای صحرایی که بطور مادرزادی بدون گانگلیون بودند، بررسی کردند (۱۱). آنها مشاهده کردند که این سلولها دارای هسته هتروکروماتین بزرگ و پروفایلهای باریک سیتوپلاسمی بودند. ICCS از طریق این پروفایلها با سلولهای عضلانی صاف مجاور ارتباط داشتند. ارگانهای این سلولها با سلولهای ICC یکسان بود و اتصالات باز با سایر سلولهای عضلانی صاف داشتند. Wedel و همکاران فراساختار فاسیکل‌های عصبی و اختلالاتی را در تیفه پایه در ده بیمار مبتلا به هیرشپرونک بررسی کردند (۱۲). آنها هیپرتروفی فاسیکل‌های عصبی و مولتی لامباسیون تیفه پایه احاطه‌کننده زوائد گلبال و پری نوروسایتها و سلولهای عضلانی صاف را مشاهده کردند.

با مشاهده موارد فوق در تحقیق حاضر موقعیت آناتومیکی و فراساختار ICC در کولون طبیعی و مبتلا هیرشپرونک در کودکان ایرانی مراجعه‌کننده به دو بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سالهای ۸۰-۱۳۷۸ مطالعه شد.

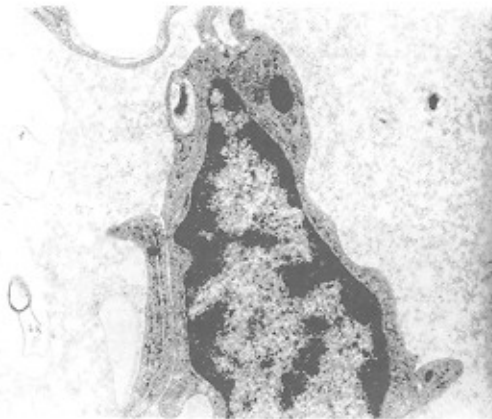
## مواد و روشها

از ده کودک ایرانی مبتلا به هیرشپرونک که تشخیص بالینی و رادیولوژیک و گاهی تشخیص بر اساس بیوپسی کولون هم داشتند با دامنه سنی ۲ ماه تا ۱۰ سال و طی سالهای ۸۰-۱۳۷۸ در بیمارستان‌های آیت الله طالقانی و مفید تهران وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تحت عمل جراحی پوئولو قرار گرفته بودند با رعایت اصول اخلاق پزشکی، نمونه‌های کولون تهیه و به شرح زیر برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (Transmission Electron Microscopy; TEM) آماده شدند.

از قسمت‌های سالم و مبتلای کولون چندین نوار باریک در جهت حلقوی یعنی عمود بر محور طولی کولون برداشته شده، برشها درون پتری دیش محتوی محلول بافر فسفات (pH = 7.4) و در زیر استریو میکروسکوپ باریک‌تر شده و حتی الامکان لایه مخاطی حذف شد. نمونه‌های تهیه شده از قسمت سالم و مبتلا در مورد هر بیمار بطور جداگانه برای فیکساسیون اولیه در وبالهای محتوی محلول فیکساتیو کارنوفسکی به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس جهت فیکساتیو ثانویه از محلول تترواکسید اسمیم ۱ درصد در همان دما استفاده و بعد از آگیری در محلول‌های اتانول با غلظت‌های بالا رونده، نمونه‌ها به کمک Propylen oxide توسط رزین اسپور اینفیلتره و سپس در همان رزین بلوک بندی شد. به منظور پلیمریزه شدن، رزین بلوک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در oven (درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد.

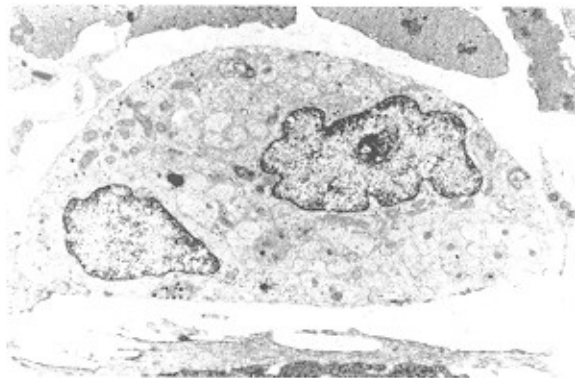
اصلاح (Triming) و برشگیری با دستگاه اولترا میکروتوم Leica انجام شد. ابتدا برشهای نیمه نازک (Semi thin) با ضخامت ۱-۲ μm تهیه، روی لام با محلول تولوئیدین بلو رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. با مشاهده جایگاه مورد نظر که شامل ضخامت لایه عضلانی جدار کولون بود در برشهای تهیه شده، بعد از اصلاح ثانویه





میکروگراف ۲: نمایی از ارگانهای سینوپلاسمی ICC به همراه اتصالاتی از نوع تماس غشایی نزدیک بین ICC با استتالهای از ICC مجاور، هسته N، میتوکندری M، اجسام متراکم DB، کائولوها C، رتیкулوم اندوپلاسمیک خشن RER، رتیкулوم اندوپلاسمیک صاف SER. در کولون سالم، بزرگنمایی  $\times 12000$

ICCs عمدتاً اتصالاتی از نوع تماس‌های غشایی نزدیک نیز داشتند به این صورت که نواحی از غشای دو سلول، مجاور یکدیگر قرار می‌گیرند. این نوع تماس‌ها بین زوایید متعدد ICCs (میکروگراف ۳) و نیز بین ICC و تنه‌های عصبی و سلولهای عضلانی صاف مشاهده شدند.



میکروگراف ۳: نمایی از شبکه اتوریاخ در کولون مبتلا، ICC در اطراف شبکه دیده نمی‌شود بزرگنمایی  $\times 7000$

ICCs معمولاً از یک طرف چنین ارتباطی را با تنه‌های عصبی و از سوی دیگر با سلولهای عضلانی صاف داشتند؛ یعنی در موقعیت بینابینی عصب و عضله واقع شده بودند. گاهی تماس‌های غشایی بین ICC و سلولهای عضلانی صاف به صورت اتصالاتی از نوع Peg & Socket بودند.

به این صورت که برجستگی از سلول عضلانی صاف به داخل فرورفتگی ICC مجاور کشیده می‌شد.

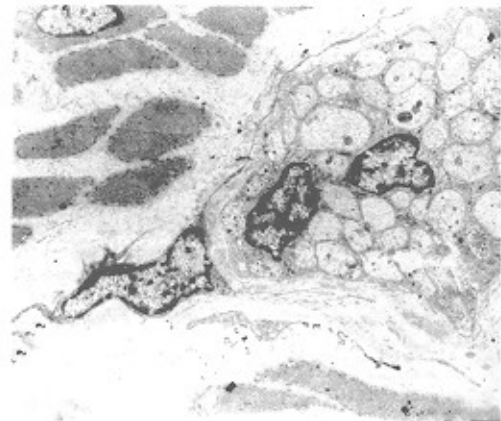
در بافت‌های مبتلا در ده نمونه که از قسمت مبتلای کولون بیماران تهیه شده بود ICC به تعداد کمتری نسبت به نمونه‌های سالم روده مشاهده و در اطراف شبکه‌های عصبی دیده نشد و ارتباطهای وسیع و موقعیت بینابینی که این سلولها در بافت‌های سالم داشتند در نمونه‌های مبتلا وجود نداشت (میکروگراف ۳).

(Retriming) نمونه‌ها، برشهای خیلی نازک (ultrathin) با ضخامت ۷۰-۹۰ nm تهیه و روی گریدهای مسی ۲۰۰ mesh قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی دوبل با اورانیل استات و سیرات سرب، گریدهای حاوی نمونه‌ها در داخل میکروسکوپ الکترونی انتقالی مدل EM900 زاپس فرار گرفته و در بزرگنمایی‌های مختلف ICCها مشاهده و از نواحی مورد نظر عکسبرداری و در نهایت تفسیر شدند.

تشخیص قطعی بیماری بر اساس اظهار نظر پاتولوژیست مبتنی بر آگانگلیونیک بودن ناحیه بود و نمونه‌هایی که توسط پاتولوژیست گانگلیونیک گزارش شد از مطالعه حذف گردید.

## یافته‌ها

در بافت‌های سالم ICC همراه با شبکه‌های عصبی زیر مخاطی (Sub Mucosal Plexus; SMP) و اتوریاخ (Aurbach Plexus; AP) مشاهده شد. جسم سلولی و استتال آنها نیز وارد کپسول شبکه‌های عصبی نمی‌شدند (میکروگراف ۱).



میکروگراف ۱: موقعیت ICC همراه با شبکه عصبی اتوریاخ AP، عضله حلزونی CM، عضله طولی LM، سلول شوان S، استتال ICC ↑ در کولون سالم این سلولها و حتی استتال‌های آنها وارد کپسول شبکه‌های عصبی نمی‌شود. در این نوع ICC جسم سلولی طولی و دوکی شکل، هسته‌ها بیضی شکل و بزرگ با حاشیه صاف یا در قسمت‌های دندانه دار با زوائد طولی و منشعب هستند. بزرگنمایی  $\times 3000$

ICCs دارای جسم سلولی طولی و دوکی شکل با زوایید طولی و منشعب، هسته‌های بیضی شکل و بزرگ با حاشیه صاف یا دندانه‌دار بودند.

اغلب هتروکروماتین متراکمی نیز روی غشا داخلی هسته ICC دیده شد (میکروگراف ۲).

سینوپلاسم نازکی که اطراف هسته را احاطه کرده بود حاوی سیستم‌هایی از رتیкулوم اندوپلاسمیک صاف و خشن، میتوکندری و اجسام متراکم بود. کائولوها در قسمت‌های مختلف غشای سلول مشاهده می‌شد. در مواردی در کنار ICC فیبرهای الاستین مشاهده گردید.

اتصالاتی از نوع (Gap Junction; GJ) بین استتال‌های ICC با یکدیگر و با سلول عضلانی مشاهده شد.

و پایانه‌های عصبی واقع شده بودند. چنین موقعیت ICC می‌تواند تا کیدی بر این فرضیه باشد که ICCها بعنوان واسطه‌های انتقال عصبی در جدار روده عمل می‌کند. فرضیه برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط Ward مطرح شد و به نظر ایشان ICC نقش مهارتی سیستم عصبی روده را چندین برابر می‌کند (۷). موقعیت بینابینی و ارتباطات وسیع ICC با شبکه‌های عصبی و سلولهای عضلانی صاف بنا بر آنچه که در تحقیق حاضر مشاهده شد احتمالاً می‌تواند نقش مهارتی این سلولها را در حرکات خودکاری روده‌ای فراهم سازد.

در این تحقیق مجاورت ICCs با فیبرهای الاستین در برخی موارد مشاهده شد. طبق نظریه محققین ممکن است ICC مشابه سلولهای عضلانی صاف دیواره آئورت تحت تاثیر کشش یا اتساع دیوار تغییر و الاستین تولید کنند که این مساله می‌تواند تا کیدی بر فرضیه مکانی و سهتوری ICC باشد که برخی محققان از جمله Ward مطرح کرده‌اند (۷).

در مطالعه حاضر مورفولوژی ICC در نمونه‌های سالم بینابینی برای مطالعه آنها در شرایط پاتولوژیک قرار گرفت. مقایسه فرا ساختار ICC در نمونه‌های سالم با نمونه‌های مبتلا نشان می‌دهد که نمای کلی سلول، هسته و کروماتین هسته‌ای مشابه است. در مطالعه تصاویر مربوط به قسمت‌های مبتلا در اکثر موارد ICC در اطراف شبکه‌های عصبی مشاهده شد و آن موقعیت بینابینی و ارتباط وسیعی که ICCs در بافت‌های سالم دارند در موارد مبتلا دیده نشد که با نتایج تحقیقات Vander Winden و همکاران (۲) همخوانی دارد. محققین عقیده دارند که فقدان چنین ارتباطی در جدار کولون بیماران مبتلا به هیرشپرونک باعث حذف اثر مهارتی ICC شده و احتمالاً در بروز اسپاسم این ناحیه مؤثر است (۲). انجام تحقیقات بیشتر در زمینه فیزیولوژی سلولهای ICC در کولون مبتلا و بررسی این سلولها در محیط ایزوله نظیر محیط کشت برای بررسی فعالیت بیوالکتریکی آنها پیشنهاد می‌شود.

### تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۳۵۴ مصوب حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است که در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه متبوع اجرا شده است. نویسندگان بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و کارشناسان محترم امور پژوهشی دانشگاه قدردانی می‌نمایند. ضمناً از زحمات پرسنل محترم واحد میکروسکوپ الکترونی IBB دانشگاه تهران، واحد میکروسکوپ الکترونی شرکت دارو پخش و واحد میکروسکوپ الکترونی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه متبوع سپاسگزاری می‌گردد.



### References

- Huizinga JD, Thuneberg L, Vanderwinden JM, Rumessen JJ: Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. Elsevier Trends J. 1997; 18: 333-403
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Liu H, Descamps D, Delaet MH, Vanderhaeghen JJ: Intrstitial cells of cajal in human colon and in Hirschprung disease. Gastroenterol 1996; 111: 901-910

بعضی از ویژگیهای ICC نظیر وجود هسته بیضی شکل بزرگ، هتروکروماتین متراکم روی غشای داخلی هسته، سیتوپلاسم نازک دور هسته، کاونولها و تیغه پایه ناکامل که در نمونه‌های سالم مشاهده شدند، در شرایط پاتولوژیک نیز قابل مشاهده بودند اما تراکم کلی ارگانها کاهش یافته بود (میکروگراف ۴).



میکروگراف ۲: نمای از فراساختار ICC در کولون مبتلا. بعضی از ویژگیهای ICC نظیر وجود هسته بیضی شکل بزرگ، هتروکروماتین متراکم روی غشای داخلی هسته، سیتوپلاسم نازک دور هسته، کاونولها، تیغه پایه ناکامل در شرایط پاتولوژی هم حفظ شده است اما تراکم کلی ارگانها کاهش یافته است. بزرگنمایی  $\times 12000$

### بحث

در تحقیق حاضر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی ICC در نواحی سالم و مبتلای کولون در بیماران مبتلا به بیماری هیرشپرونک مورد مطالعه قرار گرفت.

در نمونه‌های مربوط به قسمت‌های سالم کولون ICC به همراه شبکه عصبی زیر مخاطی و شبکه عصبی آئورباخ مشاهده شد که الگوی پراکندگی آن مشابه به نتایج مطالعاتی است که سایر محققین با استفاده از تکنیک‌های استاندارد انجام داده‌اند (۱، ۳). شناسایی ICC بر اساس معیارهایی که Huizinga و همکاران و Fausson Pellegrini و همکاران مطرح نموده‌اند انجام شد (۱، ۱۳).

هسته بیضی یا دوکی شکل بزرگ با هتروکروماتین متراکم روی سطح داخلی غشای آن، نوار نازکی از سیتوپلاسم در اطراف هسته، سیسترن‌هایی از ریبونوم اندوپلاسمیک صاف و خشن اجسام متراکم، کاونولهای سطحی و تیغه پایه با رشد متغیر از جمله ویژگیهای فراساختاری ICC در این مطالعه بودند که بر شباهت‌های آنها با سلول عضلانی صاف صحه گذاشت (۱۴). در تحقیق حاضر ICCها در اکثر نمونه‌های قسمت سالم در موقعیت بینابینی بین سلولهای عضلانی صاف

3. Rumessen JJ: Identification of Intrstitial cells of cajal significance for studies at humans small intestine and colon. Danish Medical Bulletin. 1994; 41: 275-293
4. Thuneberg L: One hundred years of Intrstitial cells of cajal. Microscopy Research Technology 1999; 47: 223-238
5. Hagger R, Finlayson C, Kahn F, De Oliver R, Chimellil Kumar D: A deficiency of Intrstitial cells of cajal in Chagasic megacolon. Journl of the Autonomic nervous system. 2000; 80: 108-111
6. Sanders KM: A case for Intrstitial cells of cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. Gastroenterology, 1996; 111: 492-515
7. Ward SM: Intrstitial cells of cajal in enteric neurotransmission. Gut, 2000; 47: 40-43
8. Langer JC, Berezin I, Daniel ED: Hypertrophic pyloric stenosis: Ultrastructural abnormalities of enteric nerves and the Intrstitial cells of cajal. Journal of Pediatric surgery. 1995; 30: 1535-1543
9. Isozaki K, Hirota S, Miyagawa JJ: Deficiency of c-kit+ cells in patients with a myopathy from of chronic idiopathic intestinal pseudo\_ obstruction. American Journal Gastroenterol, 1997; 92: 332-334
10. Yamataka A, Kato Y, Tibboel D: A lack of intestinal pacemaker ( c-kit in aganglionic bowel of patients with Hirschsprungs disease. Journal of Pediatric Surgery. 1999; 30: 441-444
11. Watanabe Y, Ito T, Lino S: Unique spindle cells in the involved ileal segment of rats with congenital aganglionosis. Journal of Pediatric Surgery, 1997; 32: 1229-1233
12. Wedel T, Holschneider AM, Krammer HJ: Ultrastructure features of nerve fascicles and basal lamina abnormalities in Hirschsprungs disease. European Journal of Surgery, 1999; 9: 75-82
13. Fausson Pellegrini MS, Thuneberg L: Guide to the identification of interstitial cells of cajal Microscopy Research Technol: 1999; 47: 248-266
14. Kimuro T, Seki K: Fine structural study of interstitial cells associated with the deep muscular plexus of the rat small intestine, with special refrence to the intestinal pacemaker cells. Cell Tissue Research, 1995; 282: 129-134

