

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

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد* - دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی** - دکتر سعید کاظمی آشتیانی*** - دکتر پوپک 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: ۸۴/۴/۴

تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۲۷

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 کمتر مورد 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 فراساختار سلول‌ها در شرایط کشت.

مواد و روش‌ها: بافت‌های لوله رحم و اندومتریم انسان با مراجعه به بیمارستان‌های امام خمینی و روئین تن آرش، تهیه شد. سلول‌های پوششی را از بافت جدا کرده و بر سطح پلاستیکی ظروف معمولی کشت داده شد و ماهیت پوششی 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، سلول‌های پوششی به شکل استوانه‌ای با هسته قاعده‌ای و میکروویلی در سطح رشد کردند که از لحاظ فراساختار شباهت زیادی به سلول‌های بافتی داشتند. همچنین بررسی‌ها 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 مؤک 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 ریز محیط (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 و پروتئوگلیکان‌ها 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 اطراف سلول موسوم به ریز محیط (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 و پروتئوگلیکان‌ها 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

فاکتورهای رشد، عوامل هورمونی، سلولی و مواد القاننده تمایز نظیر اسیدرتینوئیک برای حفظ وضعیت تمایز یافتگی سلول بکار گرفته شده است. یکی از جنبه‌های مهم تمایز مورفولوژی، تمایز فراساختاری است 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 شده است (۱۶-۱۵ و ۲۹-۲۸). 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 فراساختار دو سلول در شرایط یکسان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه نمونه و جداسازی سلول: نمونه‌های لوله رحم و رحم انسانی با رضایت آنها از ۱۵ بیمار هیستریکتومی زیر ۳۰ ساله در بیمارستان‌های روئین تن آرش و امام خمینی تهران تهیه شد. بخشی از آنها برای مطالعه فراساختار و بخشی دیگر به کشت اختصاص داده شدند. 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 ۲۵۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب آن در ۳ میلی لیتر محیط Dulbecco's modified Eagle DMEM/HAM'S F12 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). به‌طور خلاصه ابتدا اندومترיום به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتیمتری بریده شد و به داخل لوله‌های محتوی آنزیم کلاژناز نوع I (sigma; USA) منتقل و سپس ۱/۵ ساعت

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. ۶ 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، به طوری که با کشت سلول‌های پوششی پستانی بر روی ماده خارج سلولی، این سلول‌ها فنوتیپ قطبی یافته و پروتئین‌های شیر در محیط کشت ترشح می‌شود (۸-۶). همچنین با کشت سلول‌های تیروئیدی بر روی ژل کلاژن ساختاری شبیه فولیکول‌های تیروئیدی بوجود می‌آید (۹). همچنین نقش ژل ECM در تمایز مورفولوژی سلول‌های اپی‌دیدیم (۱۰)، سلول‌های اندوتلیال گلمرولی (۱۱)، دیواره سلول گرانولوزا (۱۲)، سلول‌های پوششی نای (۱۳) و غدد بزاقی (۱۴) نشان داده شده 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 دیگر توانستند با تمایز سلول‌های پوششی لوله رحم و ایجاد سیستم هم‌کشتی با اسپرم، توان حرکتی و قدرت آمیزشی اسپرم را به مدت 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،

اینسرت پوشیده شده با ژل ECM، داخل پلیت ۲۴ خانه‌ای محتوی ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت قرار گرفت و ۰/۱ میلی لیتر محیط حاوی 6×10^5 سلول در هر میلی لیتر، به آن افزوده شده، در ۳۷ درجه سانتیگراد و در CO_2 پنج درصد انکوبه شد. محیط مصرفی DMEM/HAM'S F12 حاوی ۵٪ سرم FCS بود. هر ۴۸ ساعت یکبار محیط سلول‌ها عوض شد. ۷ روز پس از آغاز کشت، سلول‌های پوششی برای مطالعه فراساختاری آماده شدند.

۴- میکروسکوپ الکترونی گذاره: ابتدا سلول‌های کشت داده شده، بافت آندومتریموم و مخاط لوله رحم به مدت ۱ ساعت با محلول کارنوفسکی ثابت شدند و پس از آن، با بافر فسفات سورنسون شسته شده و با محلول اسمیوم (Sigma, USA) ثبوت ثانویه انجام شد (۱ ساعت). آنگاه سلول‌ها و بافت، بترتیب پس از آگیری با اتانول و آغشتگی با مخلوط استون و رزین، در رزین آرالدیت ۲۰۰۵ (Sigma, USA) قالب گرفته شدند و از آنها برش‌های ۳۰۰ و ۷۰ نانومتری تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو (برش‌های ۳۰۰ نانومتری) و استات اورانیل و سترات 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 کاملاً متراکم بود و فاصله‌ای بین سلول‌ها دیده نشد، در حالی که سلول‌های کشت داده شده بر روی سطح ظروف کشت (پلاستیک) از همدیگر فاصله داشتند.

در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. آنگاه سلول‌های پوششی با روش Sedimentation از بافت هضم نشده اندومتریمی جدا شده و در داخل محیط DMEM/HAM'S F12 محتوی ۱۰٪ سرم (Fetal calf serum, Gibco; UK) به حالت معلق در آورده شد. سلول‌های پوششی لوله رحم و رحم انسان، با غلظت 6×10^5 سلول در میلی‌لیتر در بشقاب‌های ۲۴ 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 بعد سلول‌های پوششی با استفاده از Ttysin/EDTA (Gibco; UK) جدا شده و بر روی ژل ECM و سطح 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 مدت ۱۰ دقیقه باعث شد تا رسوب قهوه‌ای رنگی در سیتوپلاسم سلول پدیدار شود. هسته سلول‌ها با هماتوکسیلین رنگ شد (شکل ۱: a و b).

از بافت آندومتریموم به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل ۱: d و c). برای کنترل منفی، تک لایه‌های کشت داده شده، تمام مراحل رنگ‌آمیزی را همانند گروه مطالعه طی کردند، با این تفاوت که آنتی‌سایتوکراتین ۷ بکار نرفت (شکل ۱: e و f).

۳- کشت بر روی ژل ECM: یک روز قبل از انجام کشت، لایه نازکی از ژل ECM روی فیلتر اینسرت (Millicell culture plate Insert, Sigma, USA) با اندازه منافذ ۰/۴ میکرومتر و قطر ۱۲ میلی‌متر، گسترده و در معرض هوای استریل خشک شد. در زمان کشت، فیلتر

شکل ۱: (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 اندومترיום انسان به عنوان کنترل مثبت. (e) و (f) کنترل منفی (سلول‌های پوششی که مراحل رنگ‌آمیزی را بدون استفاده از آنتی بادی طی کرده‌اند).

دربستی 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 نسبتاً کروی شکل دیده می‌شد. این سلول‌ها تیره‌رنگ بودند و سطح‌رأسی آن به بیرون باز نمی‌شد (شکل ۳: a). هسته این سلول‌ها بزرگ و بیضی شکل و سیتوپلاسم آنها به شکل نوارباریکی در اطراف هسته خودنمایی می‌کرد. در سیتوپلاسم سلول‌های تیره و روشن، تعداد زیادی میتوکندری و rER دیده می‌شد.

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 ۲: a). 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 عمدتاً یوکروماتین با مناطق پراکنده هتروکروماتینی بود (شکل ۳: a). سلول‌های فوق به شکل تک‌لایه استوانه‌ای بر روی

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 از این 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 ۲: (a) مخاط لوله رحم و (b) اندومترיום 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 تولوئیدن بلو، درشت نمایی ۱۰۰۰X).

در مقاطع سلول‌های کشت یافته بر روی ژل، دو نوع سلول تیره و روشن تا حدودی از هم قابل تمیز بودند ولی سلول مژک‌دار دیده نمی‌شد. این سلول‌ها، به شکل تک‌لایه بر زمینه‌ای از ژل ECM تکیه کرده بودند (شکل ۲: c). بین سلول‌های استوانه‌ای اتصال محکم برقرار شده بود (شکل ۳: c). هسته سلول‌ها تقریباً کروی بودند و کروماتین یکنواختی داشتند و همچنین لایه‌ای از غشای پایه در زیر آنها قرار داشت (شکل ۳: g). در سلول‌های کشت یافته، سلول کوچک کروی دیده نشد. در سیتوپلاسم و در بالای هسته تعداد زیادی میتوکندری با کریستای کاملاً واضح قرار داشتند و علاوه بر آن، rER نیز مشاهده می‌شد. سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک (ظروف کشت معمولی) تمایز نیافته بودند و در مقاطع میکروسکوپی به شکل لایه‌ای از سلول‌های دوکی و کشیده ظاهر شدند (شکل ۲: e).

۴- فراساختار سلول‌های رحمی: در مقاطع میکروسکوپی، سلول‌های پوششی بافت رحم به شکل تک‌لایه‌ای از سلول‌های استوانه‌ای با میکروویلی در سطح ظاهر شدند (شکل ۲: b). هسته بیضی شکل سلول‌ها، یوکروماتین با مناطق پراکنده هتروکروماتین بود (شکل ۳: b). زیر

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 سیرتات سرب و استات اورانیل، درشت نمایی ۳۰۰۰X). (e) و (g) سلول پوششی لوله رحم و (f) و (h) رحم کشت یافته بر روی ژل ماده خارج سلولی (مقاطع نازک، رنگ آمیزی سیرتات سرب و استات اورانیل، درشت نمایی ۱۵۰۰۰X. S: داربست، E: ژل ماده خارج سلولی، N: هسته، M: میتوکندری)

سلول‌های کشت یافته، مشابه سلول‌های پوششی بافت، به شکل تک‌لایه‌ای و استوانه‌ای بودند و برخلاف آن بر زمینه‌ای از ژل ECM قرار گرفته بودند (شکل ۲: 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: d of). هسته یوکروماتین، در بخش قاعده‌ای و با فرورفتگی‌هایی در پوشش آن دیده می‌شد.

کشت سلول نیز از هورمون‌های استروئیدی استفاده کردند (۲۷). همچنین در سال ۱۹۹۵ 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 کاملاً یکسان (محیط DMEM/ HAM'S F12 و 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، تأثیر خود 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 متأثر از القای ژل، تکثیر یافته و سطح آن را پر می‌کنند. در مدت کشت بتدریج بر طول سلول‌ها افزوده شده و غشای پایه در زیر سلول‌ها ظاهر می‌شود. به طوری که در پایان روز

سیتوپلاسم حاوی تعداد نسبتاً زیادی میتوکندری با کریستاهای واضح بود (شکل ۳: h)، این ارگانل به شکل کروی یا بیضوی در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده شده بود. علاوه بر آن، مخازن rER نیز در سیتوپلاسم دیده می‌شدند. سلول‌های کشت یافته بر پلاستیک (ظروف کشت معمولی) تمایز نیافته بودند و در 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 داده شد. البته پیش از این نیز این کار انجام شده بود. در سال ۱۹۹۵ Thomas و همکاران، سلول‌های پوششی لوله رحم اسب را بر روی ژل ECM و در حضور ۱۷ بتا استرادیول 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 رحم گاو 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 سلول‌های 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 بهبود حرکت 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 گرفته بود. در سال ۱۹۹۰ Schatz و همکاران، سلول‌های پوششی رحم انسان را با بیوپسی از رحم جدا کردند و بر ژل ECM کشت دادند و در محیط

واقع در پاسخ به ترکیب ماکرومولکولی اطراف، سلول ساختار مناسبی بدست می‌آورد. البته تفاوت‌های جزئی نیز ظاهر می‌شود. این که چه مکانیسم‌هایی عمل می‌کنند و به‌رغم وجود ریز محیط 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 نداشته باشد که البته 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 کاملاً 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* و *in vitro* تا حدودی قابل توجیه است. *in vivo*، سلول‌های پوششی روی داربستی 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 (۳۳ و ۳۴). البته مطالعه *comer* و همکاران نشان داد که هورمون‌های استروئیدی قادر به تأثیر 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) و *Classen-Linke* و همکاران (۲۸)، بکارگیری هورمون‌های استروئیدی در سطح رأسی سلول، مژک‌ها ظاهر شدند. عامل دیگر در ایجاد اختلاف فراساختاری، احتمالاً ترکیب محیط *DMEM/ HAM'S F12* و تفاوت آن با مایع بافتی اطراف سلول‌های لوله رحم و رحم، در

هفتم، سلول‌ها شکل استوانه‌ای گرفته و غشای پایه در زیر آنها تشکیل شده است. 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 روزی که 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 جزئی بین آنها نشان داد. مثلاً 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 شباهت‌های زیادی داشتند. مثلاً 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 پارامزوفریک 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 و سلول‌های بخش کودال به سلول‌های رحمی تمایز پیدا می‌کنند. با توجه به یافته‌های این بررسی بنظر می‌رسد که مکانیسمی مشابه، در دوران بعد از تولد و در محیط *in vitro* عمل می‌کند. به این ترتیب که با کشت دو سلول مختلف در ریز محیط یکسان به سبب القای یکسان، ویژگی‌های فراساختاری مشابه ایجاد می‌شود. در

فرا ساختاری، فراهم کردن شرایطی کاملاً 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 داده شده باشند، کاهش می‌یابد و دو نوع سلول از لحاظ ساختار ویژگی‌های مشابهی کسب می‌کنند.

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

نویسندگان مراتب تشکر خود را از مساعدت‌های صمیمانه مسئولان محترم پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند. همچنین از کارکنان محترم اتاق عمل بیمارستان‌های امام خمینی و رویین تن آرش تهران برای تهیه نمونه‌های لوله رحم و اندومترئوم 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.

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 فرا ساختاری بوده باشد. البته تفاوت ژل ECM و غشاء پایه طبیعی را نیز نباید از نظر دور داشت. همانطور که ذکر شد، ژل ECM از نوعی تومور موشی استخراج می‌شود (۴) و به این ترتیب از لحاظ ترکیب ماکرومولکولی با غشای پایه زیر سلول‌های پوششی متفاوت است و در نتیجه القاهای متفاوتی نیز خواهد داشت. بنظر می‌رسد: ۱- سلول‌های پوششی کشت داده شده بر ژل ECM بدون حضور سلول‌های استرومایی و عوامل هورمونی، فنوتیپ سلول پوششی را بدون کسب جزئیات فرا ساختاری سلول مبدأ بدست می‌آورند (مثلاً سلول‌های پوششی کشت شده مژک ندارند). به بیان دیگر، ژل به تنهایی قادر است شکل استوانه‌ای سلول پوششی و ظاهر قطبی آن را در کشت حفظ کند ولی احتمالاً برای ایجاد سایر جزئیات

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 USA* 1982; 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
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, Fucfey C, Secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1419-1423.

- 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 Membrane Matrix. *Dev Growth Diff* 1999; 41: 207- 216.
15. Bentin- Ley U, Horn T, Sjogren A, Sorensen S, Falck Larsen J, et al. Ultrastructure 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- Dimensional 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 Vitro. *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, Macaque 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 Caprine Oviductal Cells and Oviductal Explants in Vitro. *Theriogenology* 2003; 60:533- 543.
23. Joshi MS. Growth and differentiation of the Cultured Secretory Cells of the Cow Oviduct on Reconstituted basement membrane. *J EXP Zool* 1991; 260:229- 238.
24. Mahfandi 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. Endometrial 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, Gursipide E. Culture of Human Endometrial Cells Under Polarizing Conditions. *Differentiation* 1990; 42:184- 190.
28. Classen- Linke I, Knsche M, Knauth R, Beier HM. Establishment of a Human Endometrial Cell Culture System and Characterization of Its Polarized Hormon Responsive Epithelial Cells. *Cell Tissue Res* 1997; 287:171- 185.
- ۲۹- باغبان اسلامی نژاد، محمدرضا؛ رضازاده، مجتبی؛ کاظمی، سعید: فراساختار سلول‌های اپیتلیال رحم انسانی کشت یافته روی ماتریکس برون سلولی و پلاستیک. مجله یاخته، ۱۳۸۲، سال پنجم شماره ۱۹، صص: ۱۵۳-۱۴۵.
30. Thomas PG, Igotz 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 Oviduct 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 Progesterone Receptors Mediate the Inhibitory Effects of Progesterone 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 Follicular 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),
Eftekhari 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. Ultra structurally different cells grows and acquires the same structure when being cultured under the same microenvironment.

Key words: Epithelial cells/ Extracellular matrix