فرا ساختار سلولهای اپیتلیال رحم انسانی، کشت یافته روی ماتریکس برون سلولی و پلاستیک

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد M.Sc.☆*، دکتر مجتبی رضازاده Ph.D.☆*♦
دکتر تقی طریحی Ph.D.*، دکتر سعید کاظمی Ph.D.☆

☆ پژوهشکده رویان، بخش تحقیقات، گروه جنین شناسی

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** بررسی سلولهای کشت یافته اپی تلیال رحم انسانی روی ماتریکس برون سلولی و پلاستیک Polstyrene در مقایسه با سلولهای اپی تلیال بافت رحم.

* **مواد و روشها:** آندومتر رحم انسان، تهیه شده از نمونه‌های هیسترکتومی، به دو قطعه تقسیم گردید. یک قطعه برای مطالعه TEM (Transmission Electron Microscopy) و قطعهٔ دیگر برای کشت استفاده شد. با استفاده از آنزیم کلاژناز نوع I (۰/۲۵ درصد) سلولها از بافت جداگردیده و در فلاسک پلاستیکی کشت داده شدند (کشت غیر قطبی). برای تعیین نوع سلول درکشت اولیه از رنگ‌آمیزی با آنتی سایتوکراتین ۷ استفاده شد. ۵ روز پس از کشت، با استفاده از آنزیم ۰/۰۵ درصد تریپسین در محلول ۵۳ میلی مولار EDTA، سلولهای کف پلاستیک جدا و روی ژل ECM (Extracellular Matrix) کشت داده شدند (کشت قطبی). بعد از چند روز جزایر سلولهای قطبی ظاهر گردید. سلولهای کشت یافته روی پلاستیک و ژل ECM و نیز بافت آندومتریوم برای مطالعه TEM پاساژ داده شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج رنگ‌آمیزی نشان داد که سلولها در کشت اولیه ماهیت اپی تلیالی دارند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی سلولهای پوششی آندومترکشت یافته روی پلاستیک نشان داد که این سلولها بر خلاف حالت *In vivo* کم ارتفاع، دوکی شکل و کشیده بوده، هسته قسمت اعظم سلول را تشکیل می‌دهد. سیتوپلاسم اندک، تعداد کم میتوکندری و rER (Rough Endoplasmic Reticulum) و وجود واکوئل از دیگر ویژگیهای این سلولها است. بین سلولها اتصال محکم که یکی از نشانه‌های مهم قطبیت سلول در سطح فرا ساختاری است مشاهده نشد.
تصاویر سلولهای کشت یافته روی ژل ECM نشان داد که این سلولها همانند حالت *In vivo* استوانه‌ای با هسته هایی عمدتاً در بخش قاعده‌ای هستند. سلولها توسط اتصال محکم و دسموزوم به هم دیگر بسته شده‌اند، این سلولها بر خلاف حالت *In vivo* هسته کاملاً یوکروماتینی داشته و از ناحیه غشاء جانبی پنجه در پنجه می‌شوند.

* **نتیجه‌گیری:** سلولهای اپی تلیال اندومتریوم انسان، زمانی که بر پلاستیک کشت می‌شوند خصوصیات مرفولوژیک خود را از دست می‌دهند و غیر قطبی می‌شوند. همین سلولها، پس از جدا شدن از سطح پلاستیک و کشت روی ECM خصوصیات مرفولوژیک از دست رفته را باز می‌یابند و کاملاً قطبی می‌شوند.

گل واژگان: ژل ECM، سلولهای اپی تلیال اندومتریوم انسان، قطبیت سلولی

مقدمه

کشت سلولهای جانوری و انسانی در محیط آزمایشگاهی (*In vitro*) با تقلید از محیط *In vivo* همواره مورد توجه محققین بوده است. در این بین سلولهای اپی تلیال جایگاه خاصی داشته، محققین با کشت آن اهداف مختلفی از جمله مطالعهٔ تمایز سلولها، بر هم کنش سلولی و ترشح برداری را در نظر دارند. کشت استاندارد و معمول سلول، مدل مناسبی برای دستیابی به اهداف مذکور نیست، زیرا زمانی که سلولهای اپی تلیال بر روی پلاستیک یا سطح شیشه کشت می‌شوند، ویژگیهای ساختاری و عملکرد تمایز یافته سلول به تدریج تغییر می‌کند (۱، ۲، ۳، ۴، ۵). این تغییرات به صورت از دست رفتن قطبیت سلول پدیدار می‌شود. سلولهای کشت شده، شکل استوانه‌ای یا مکعبی را از دست داده، پهن می‌شوند و اتصالات جانبی سلولها از بین می‌رود. چنین سلولهایی که با حالت *In vivo* فاصله زیادی دارند، مدل مناسبی برای مطالعه اهداف فوق نیستند. به همین دلیل محققین کوشیده‌اند عال و عوامل از دست رفتن تمایز سلولی را یافته و در نهایت شرایطی فراهم آورند تا سلولها در حد امکان، خصوصیات مرفولوژیک و عملکردی خود را در محیط آزمایشگاهی حفظ نموده و کمتر دستخوش تغییرات گردند.

قطبیت سلول پوششی به مفهوم وجود نواحی (domain) مختلف در غشاء و سیتوپلاسم آن است در سطح فرا ساختاری، یکی از نشانه‌های قطبیت سلول، برقراری اتصال محکم میان سلولهای مجاور است که از مخلوط شدن پروتئینهای غشاء راسی با غشاء قاعده‌ای - جانبی جلوگیری می‌کند. یافته‌های محققین پیشین نشان می‌دهد که ماتریکس خارج سلولی یکی از عوامل اصلی ایجادکننده قطبیت و حفظ عملکرد متمایز سلولی در محیط کشت است. Chambard و همکاران در سال ۱۹۸۱ سلولهای تیروئیدی را روی ژل Collagen کشت دادند، در این شرایط، سلولها اطراف قطعات ژل کلاژن تجمع نموده، نسبت به آن قطبی شدند و ساختاری شبیه فولیکولهای تیروئیدی تشکیل شد. این محققین نتیجه گرفتند که بر هم کنش غشاء سلولی با اجزاء خارج سلولی عامل تعیین کننده در قطبی شدن سلولها است (۶). Benali و همکاران در سال ۱۹۸۹، سلولهای غده‌ای نای گاو را روی ECM کشت دادند (۷). نتایج این محققین یافته‌های Chambard و همکاران را تائید نمود. یافته‌های Hootman و همکاران در سال ۱۹۸۸ در کشت سلولهای اپی تلیال مجرای پانکراتیک خوکچه هندی نیز مؤید این نکته است که برای حفظ حالت تمایز سلولی، وجود ECM به عنوان سوبسترای کشت سلول ضرورت دارد (۸). محققین دیگر نیز تجربیات مشابهی را در کشت سلولهای اندومتریومی بر عصارهٔ غشاء پایهٔ طبیعی استخراج شده از تومور موش Engelbreth-Holm-Swarm داشته‌اند (۹، ۱۰).

عامل موثر دیگر در القای تمایز سلولی و ایجاد قطبیت در محیط کشت، تغذیه از طریق غشاء قاعده‌ای جانبی است (۱۱). این پدیده از طریق سیستم کشت دو حفره‌ای (Dual Chamber) محقق می‌شود. در حفرهٔ بالایی سلولهای اپی تلیالی و در حفرهٔ پایینی محیط کشت قرار می‌گیرد. سلولها از طریق غشاء قاعده‌ای جانبی با دسترسی به مواد غذایی قطبی می‌شوند. Hadley و همکاران در سال ۱۹۸۷ سلولهای سرتولی موش صحرایی را با این روش کشت داده، تمایز و ترشح قطبی این سلولها را مطالعه نمودند (۱۲، ۱۳).

محققین با استفاده از دو عامل ECM و تغذیه از طریق غشاء قاعده‌ای جانبی، سعی در قطبی کردن سلولهای مختلفی نموده‌اند که در این بین، سلولهای اپی تلیال رحم، در مدل حیوانی جایگاه ویژه‌ای داشته است. کشت قطبی (کشت بر روی ژل ECM) سلولهای اپی‌تلیال رحم خوکچه هندی (۱۴، ۱۵) موش صحرایی (۱)، خرگوش (۵)، موش بر نقش عمومی در مطالعه فیزیولوژی سلولهای اپی تلیال، به طور اخص، مدل مناسبی برای مطالعهٔ لانه گزینی جنین است. همچنین از کشت قطبی این سلولها می‌توان در بهبود رشد و تکوین جنین سود برد. متأسفانه کشت قطبی سلولهای پوششی رحم انسان نسبت به مدل حیوانی به دلیل مشکلات دسترسی به بافتهای انسانی کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد.

هدف از این مطالعه، قطبی کردن سلولهای اپی تلیوم رحم انسان روی ژل ECM، در یک سیستم دو حفره‌ای (Dual Chamber) است. در مطالعهٔ حاضر، برای کشت قطبی از سلولهای پاساژ اول استفاده شده است. محققین پیشین سلولهای اپی تلیال را در کشت اولیه قطبی نموده‌اند. به نظر می‌رسد استفاده از سلولهای پاساژ اول در کشت قطبی، تا اندازه‌ای مشکل دسترسی به بافتهای انسانی را برطرف کند زیرا با کشت اولیه سلولهای اپی تلیالی تکثیر می‌یابند و در نتیجه میزان زیادی از آن‌ها برای استفاده در کشت قطبی در دسترس خواهند بود.

* روش انجام کار

۱ـ تهیه نمونه

نمونه‌های رحم انسانی با مراجعه به بیمارستانهای آرش و امام خمینی تهران از بیماران، در سن پیش از یائسگی، به دنبال هیسترکتومی ناشی از عارضه در لوله رحم یا میومتریوم (مشکلاتی غیر از بیماری اندومتریوم) تهیه شد. نمونه‌ها با هماهنگی و اخذ رضایت نامه از بیمار دریافت شد. در اتاق عمل بیمارستان برای جداسازی آندومتریوم، ابتدا یک برش صلیبی در دیوارهٔ قدامی رحم ایجاد و دیواره‌ها کنار زده شد و با لبهٔ تیغ بیستوری، آندومتریوم دیوارهٔ خلفی فوندوس رحم جدا گردید و در داخل لولهٔ ۱۳ سی‌سی محتوی محیط HBSS (Hank´s Balanced Slat Solution) قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها در شرایط استریل چند بار با HBSS شسته شدند تا کاملاً عاری از خون و لخته خونی شدند. سپس آندومتریوم به دو قطعه تقسیم شد. یک قطعه برای مطالعهٔ TEM و قطعه دیگر برای کشت مورد استفاده قرار گرفت. قطعه‌ای که برای TEM در نظر گرفته شده بود پس از ثبوت با محلول کارنوفسکی و اسمیوم ۱ درصد هر کدام به مدت یک ساعت، آبگیری با درجات صعودی اتانول (Merck)، آغشتگی با مخلوط استون (Merck) و رزین آرالدیت (Sigma) در داخل قالبهای رزینی قرار داده شد.

۲ـ جداسازی سلول و کشت غیر قطبی (کشت روی پلاستیک)

برای جداسازی سلولهای پوششی اندومتریوم، تکه‌های بافتی به قطعات

ریز یک میلیمتری بریده شد و به لوله ۱۳ سی‌سی محتوی آنزیم کلاژناز نوع ۲۵/۰درصد (Sigma) منتقل و به مدت ۱/۵ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵درصد CO2 انکوبه شد. تحت تاثیر آنزیم، غدد آندومتریوم و قطعات سلولهای پوششی سطحی از ساختارهای زیرین جدا شده و به حالت شناور در داخل آنزیم قرار گرفت، برای جداسازی بخش اپی تلیالی از بافت هضم نشده از تکنیک Unit gravity sedimentation استفاده گردید. بدین ترتیب که محتویات لوله هم زده شده و به صورت عمودی قرار گرفت. پس از ۴۰ ثانیه، $\frac{2}{3}$ بالایی (حاوی بخش اپی‌تلیال) برداشته شد و $\frac{1}{3}$ پائینی (حاوی بافت هضم نشده) بیرون ریخته شد. بخش اپی‌تلیالی در داخل فلاسکهای ۵۰ میلی لیتری و با محیط DMEM/F12 (Dulbecco modified Eagles medium /F12 Ham, Sigma) محتوی ۱۰درصد FCS (Fetal Calf Serum, seromed) و در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵درصد CO2 کشت داده شد. غلظت سلولهای مورد استفاده $2-5\times10^5$ سلول در میلی لیتر بود.

۳ـ ایمونو سیتوشیمی

برای تعیین نوع سلولهای کشت شده در کشت اولیه از آنتی سایتوکراتین ۷ استفاده شد. برای این منظور سلولها روی لامل (NUNC) کشت داده شدند. برای رنگ‌آمیزی از Dako Envision System بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا پراکسید داخلی سلولها با استفاده از محلول مهارکننده پراکسید خنثی گردید، سپس آنتی سایتوکراتین ۷ اثر داده شد و به دنبال آن پلی‌مر به همراه آنتی بادی ثانویه نشان دار شده با پراکسید استفاده شد و در پایان با افزودن محلول سوبسترا-کروموژن در اثر واکنش با پراکسید رسوب قهوه‌ای رنگ در سیتوپلاسم سلولهای اپی تلیالی به عنوان شاخص وجود سایتوکراتین ایجاد شد. از رنگ هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی هسته سلولها استفاده گردید (شکل ۳). نمونه‌ها با میکروسکوپ معمولی بررسی و رنگ‌پذیری سلولها با گروه کنترل (بافت اندومتریوم) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۴ـ پاساژسلول و کشت قطبی (کشت روی ژل ECM):

در کشت غیر قطبی پس از گذشت پنج روز، ۷۰درصد سطح پوشیده از سلولهای اپی تلیالی بود و از این سلولها برای کشت قطبی استفاده گردید. بدین ترتیب که یک روز قبل از کشت قطبی، ژل ECM (Sigma) به نسبت یک به چهار با محیط DMEM/F12 رقیق شد و به میزان ۰/۵ سی‌سی روی Filter Insert (Millipore) با اندازه منافذ ۰/۴ میکرومتر و قطر ۱۲ میلی متر ریخته شد. Insert به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا فرآیند ژل شدن کامل شود و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کاملاً استریل خشک گردید.

در روز کشت قطبی، با استفاده از آنزیم ۰/۵درصد ترپسین (Gibco) در محلول ۵۳ میلی مولار EDTA (Sigma)، سلولهای غیر قطبی از کف فلاسک جدا شده، پس از خنثی کردن آنزیم و دو بار شستشو با سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ دور در دقیقه، برای کشت قطبی استفاده شدند. تعداد سلولهای مورد استفاده در کشت قطبی 4×10^5 سلول در میلی لیتر بود.

برای ایجاد سیستم دو حفره‌ای (Dual chamber) از ظرف ۲۴ خانه‌ای Falcon استفاده گردید. در داخل هر خانه، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید، سپس Insert پوشیده با ژل ECM داخل آن قرار گرفت و سرانجام ۰/۱ میلی لیتر محیط حاوی سلولهای اپی تلیالی روی Insert اضافه گردید و در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵درصد Co2 انکوبه شد. در چنین شرایطی سلولها در حفرهٔ بالایی و بر روی کف Insert چسبیده و از طریق منافذ کف آن مواد غذایی را از حفرهٔ پائینی دریافت می‌کند. محیط سلولها هر دو روز یکبار عوض شد.

۵ـ محیط مصرفی جهت کشت سلولهای قطبی

برای کشت قطبی از محیط بدون فنول DMEM/F12 (Sigma) حاوی ۱۰ میکرو لیتر در میلی لیتر رتینونیک اسید ۱۰ میکرو لیتر در میلی لیتر EGF(Epidermal Growth Factor, Sigma)، ۱۰ میکرولیتر در میلی لیترترانسفرین (Sigma) و ۵درصد (Seromed) FCS استفاده گردید.

۶ـ آماده سازی سلول برای مطالعه فرا ساختاری

الف) سلولهای غیر قطبی:

سلولها روی لامل کشت شدند، به همراه آن مراحل فیکس و آبگیری و آغشتگی را به ترتیب با کارنوفسکی + اسمیوم ۱درصد، اتانول و مخلوط رزین و استون طی کردند. برای قالب‌گیری از تکنیک flat embedding استفاده شد. بدین ترتیب که قالبها با رزین آرالدیت پر شدند و لامل به همراه سلولهای سطح آن، بر روی قالب محتوی رزین قرار گرفت. پس از انجام عمل پلی‌مریزاسیون، لامل از سطح رزین جدا شده سلولها در سطح رزین باقی ماندند.

ب) سلولهای قطبی:

سلولها به همراه Insert و با استفاده از محلول کارنوفسکی فیکس اولیه شدند پس از شستشو با بافرفسفات سورنسون، ژل ECM سطح Insert به همراه سلولهای قطبی، قطعه قطعه شدند و فیکس ثانویه با اسمیوم ۱درصد انجام شد. پس از آبگیری با اتانول و آغشتگی بامخلوط رزین آرالدایت واستون عمل قالب‌گیری انجام شد.

قالبها به ضخامت‌های ۵۰۰ و ۷۰ نانومتری برش‌گیری شدند. برشهای ۵۰۰ نانومتری با تولوئیدین‌بلو و ۷۰ نانومتری با اورانیل استات و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ الکترونی Ziess ۱۰۰ کیلوولت بررسی شدند.

یافته‌ها

* ۱) کشت غیرقطبی

در کشت غیرقطبی، تعدادی از قطعات سلولهای اپی‌تلیالی سطحی و غده‌ای به سطح پلاستیک چسبیده، و به شکل explant عمل می‌نمایند. تعدادی دیگر از قطعات سلولهای اپی‌تلیالی به کف نمی‌چسبند و به

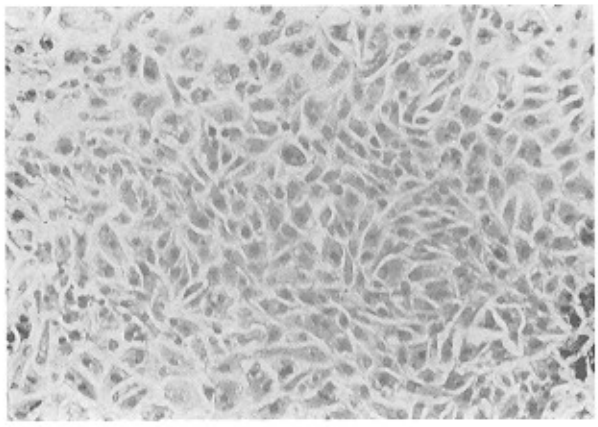
حالت شناور در محیط قرار می‌گیرند. این قطعات، در زمان تعویض محیط، بیرون ریخته می‌شوند. قطعات چسبیده منشاء کشت سلول می‌شود.

پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلولهای محیطی قطعات اپی‌تلیالی، شروع به تکثیر نموده، جزایر کوچک سلولی ایجاد می‌نمایند، به تدریج این جزایر بزرگتر شده (شکل ۱) و در بعضی نقاط به همدیگر می‌رسند. بدین ترتیب سلولها، کف ظرف را پر می‌نمایند.

شکل ۱: فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته روی پلاستیک: روز سوم کشت. در تصویر جزیره‌ای از سلولهای غیر قطبی دیده می‌شود. بزرگنمایی ×۱۰۰

۲) رنگ‌آمیزی با آنتی سایتوکراتین

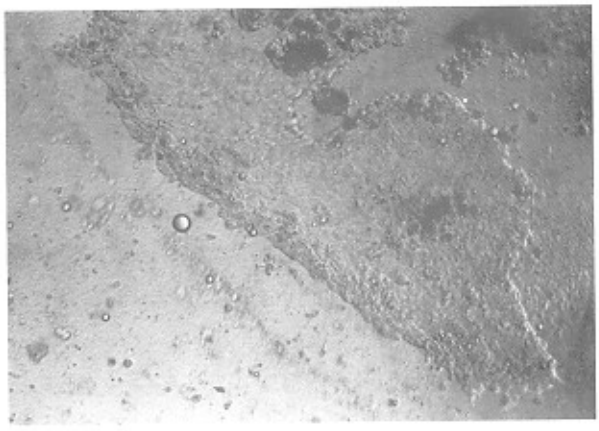
در کشت اولیه بر روی پلاستیک، با استفاده از آنتی سایتوکراتین ۷، سیتوپلاسم سلولهای کشت یافته به رنگ قهوه‌ای در آمد که این موضوع نشان دهندهٔ وجود سایتوکراتین ۷ و در نتیجه ماهیت اپی تلیالی سلولهاست (شکل ۲).



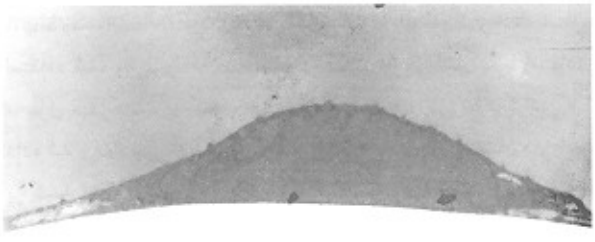
شکل ۲: فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته روی پلاستیک: سایتوکراتین ۷ در سیتوپلاسم سلولهای اپی تلیال به رنگ قهوه‌ای در آمده است. رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی. بزرگنمایی ۲۰۰× (تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۷)

۳) کشت قطبی

در کشت قطبی، سلولهای اپی‌تلیالی بر روی ژل ECM می‌چسبند و جزایر سلولهای قطبی را ایجاد می‌نمایند (شکل ۳) سلولهای شناور در زمان تعویض محیط کشت، از داخل Insert خارج می‌شوند. سلولهای قطبی به کندی رشد کرده و در مقایسه با سلولهای غیرقطبی دیرتر کف Insert را پر می‌نمایند. این زمان بسته به اینکه چه تعداد سلول بتوانند به سطح ژل ECM بچسبند، متفاوت است. هرچه تعداد سلولهای چسبیده زیاد باشند زمان پر شدن کف Insert کمتر می‌شود به‌طور متوسط در کشت قطبی، این زمان بین ۱۵-۱۲ روز می‌باشد. در حالی که در کشت غیرقطبی در طی ۶-۵ روز سلولها کف فلاسک را پر می‌نمایند.



شکل ۳: فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته روی ژل ECM، روز پنجم کشت. در تصویر جزیره‌ای از سلولهای غیر قطبی دیده می‌شود. بزرگنمایی ×۱۰۰



شکل ۴: الکترون میکروگراف سلول کشت یافته روی پلاستیک: سلول بر خلاف حالت *In vivo* دوکی شکل و کشیده است. بزرگنمایی ×۳۰۰۰

۴) فراساختار

الف) فراساختار سلولهای پوششی رحم در حالت *In vivo*

۱) تصاویر مقاطع نیمه نازک: این سلولها استوانه‌ای بوده و به صورت تک لایه و تنگاتنگ، در کنار هم قرار گرفته‌اند. در سطح رأسی سلولها میکرویلی مشاهده می‌شود. هسته سلولها تقریباً بیضی شکل بوده، در بخش قاعده‌ای، میانی و یا رأسی قرار می‌گیرند. زیر سلولهای پوششی، استروما، حاوی سلولهای استرومایی و عروق خونی مشاهده می‌شود (شکل ۱۱).

۲) تصاویر مقاطع نازک: سلولهای پوششی روی غشاء پایه قرار دارند. این سلولها در بخش بالایی غشاء جانبی توسط کمپلکس

اتصالی به سلولهای مجاور بسته شده‌اند. پایین‌تر از اتصالات، غشاء سلول به صورت عمودی تا غشاء پایه سلول امتداد می‌یابد و هیچ‌گونه پنجه در پنجه شدن بین سلولها اتفاق نمی‌افتد. هسته سلولهای پوششی عمدتاً یوکروماتین بوده، مناطق هتروکروماتین اغلب زیر پوشش هسته تجمع پیدا کرده‌اند در بعضی موارد مناطقی از پوشش هسته پیچ خورده هستند. سیتوپلاسم سلولهای پوششی حاوی مخازن شبکه آندوپلاسمی خشن (rER)، گلژی کمپلکس، میتوکندری و تعدادی واکوئل است.

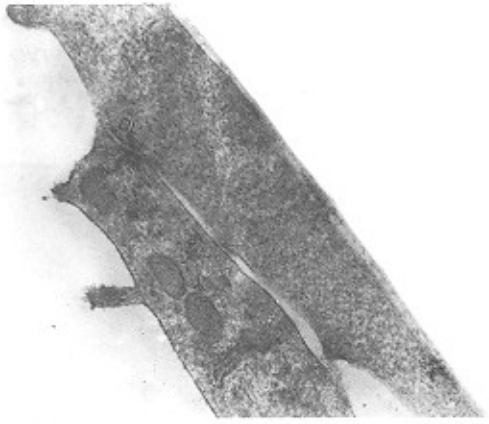
rER در سرتاسر سلول وجود داشته و بیشتر در نیمهٔ بالایی سلول تجمع دارد. میتوکندریها تقریباً کوچک و کروی بوده و در لابلای مخازن rER جای گرفته‌اند. واکوئلها در اطراف هسته و بیشتر در زیر هسته تجمع یافته‌اند (شکل ۹).

ب) فرا ساختار سلولهای پوششی رحم کشت شده روی پلاستیک

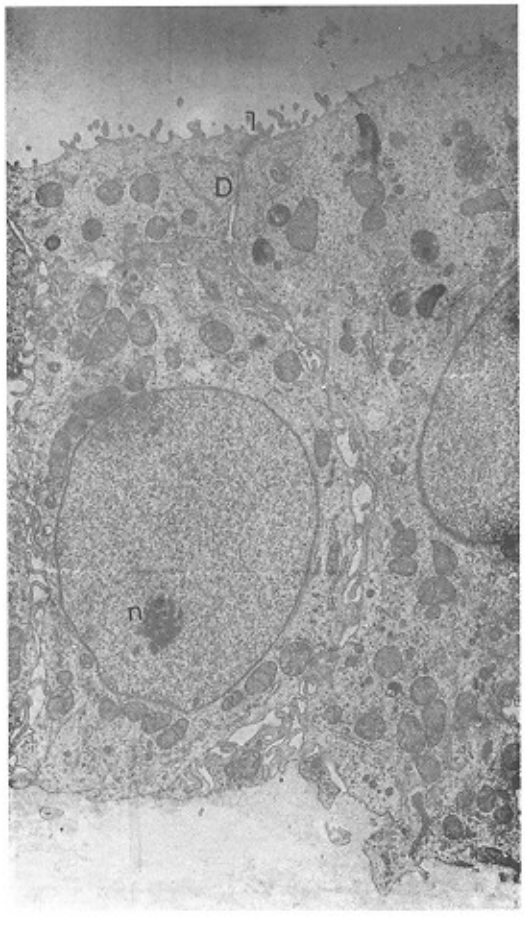
۱) تصاویر مقاطع نیمه نازک: این سلولها بر خلاف حالت *In vivo* کم ارتفاع، دوکی شکل و کشیده بود، قسمت اعظم سیتوپلاسم را هسته‌ای دوکی شکل اشغال می‌کند.

۲) تصاویر مقاطع نازک: سلولهای کشت یافته روی پلاستیک بر خلاف حالت *in vivo* میکرویلی نداشته، بر سطح آنها در بعضی مناطق و به ندرت زوائدی انگشت مانند وجود دارد. امتداد این سلولها به طور ساده روی هم قرار گرفته و اتصال محکم بین آنها ایجاد نمی‌شود. در بعضی موارد اتصالات شبه دسموزوم وجود دارد (شکل ۶). هسته سلول به طور یکنواخت یوکروماتین بوده و فرورفتگی‌های نسبتاً عمیقی دارد. سیتوپلاسم سلول الکترون دنس بوده، حاوی تعدادی rER و میتوکندری است. میتوکندریها تقریباً بیضی شکل هستند در داخل سیتوپلاسم تعدادی واکوئل با مواد الکترون دنس مشاهده می‌شود (شکل ۵).

شکل ۵: الکترون میکروگراف سلول کشت یافته روی پلاستیک: در نزدیکی هسته واکوئل (V) حاوی مواد الکترون دنس دیده می‌شود. بزرگنمایی ×۲۰۰۰۰



شکل ۶: الکترون میکروگراف سلول کشت یافته روی پلاستیک: دو سلول روی هم قرار گرفته و تنها اتصالی شبیه دسموزوم (DL) در بین آنها ایجاد شده است و در سطح سلول زائده انگشتی (P) شکل دیده می‌شود. بزرگنمایی ×۲۰۰۰۰



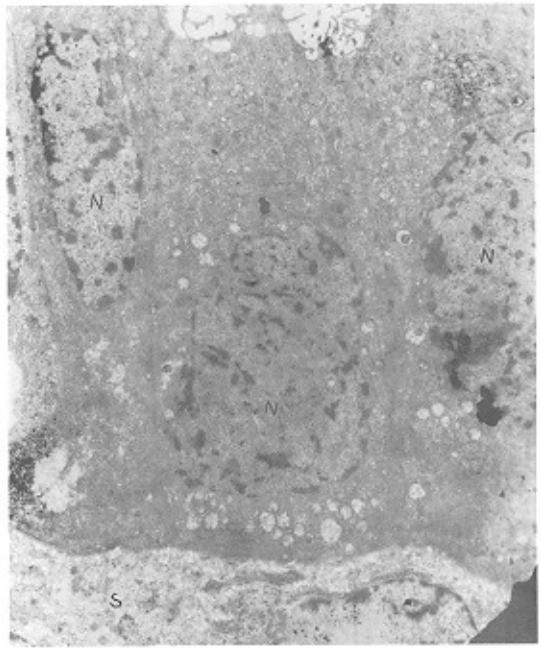
شکل ۷: الکترون میکروگراف سلول کشت یافته روی ژل ECM: سلول استوانه‌ای بوده، و هسته در بخش قاعده‌ای قرار گرفته است اتصال محکم (T) و دسموزوم (D) ایجاد شده است، سلول هسته‌ک (n) واضحی دارد. بزرگنمایی ×۳۰۰۰

ج) فراساختار سلولهای پوششی رحم کشت شده روی ژل ECM:

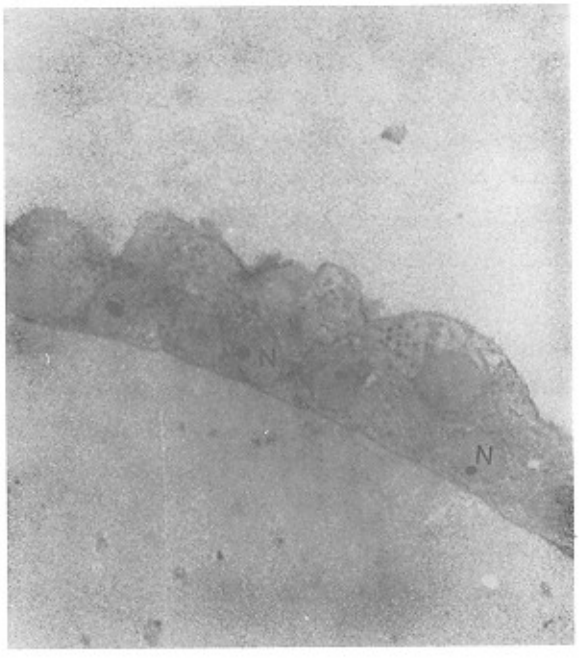
۱) تصاویر مقاطع نیمه نازک: این سلولها همانند حالت *In vivo* از یک لایه سلول استوانه‌ای تشکیل یافته است. در سطح سلولها

میکروبلی مشاهده می‌شود. هستهٔ سلولها کروی تا بیضی شکل بوده و عمدتاً در نیمهٔ پائینی سلول واقع شده است. بر خلاف حالت *In vivo*، زیر سلولهای پوششی لایه‌ای از ژل ECM وجود دارد (شکل ۱۰).

شکل ۸: الکترون میکروگراف سلول کشت یافته روی ژل ECM: سلول استوانه‌ای بوده و هسته در بخش قاعده‌ای قرار گرفته است اتصال محکم (T) و دسموزوم (D) ایجاد شده است. بزرگنمایی ۳۰۰۰۰×



شکل ۹: الکترون میکروگراف سلولهای پوششی رحم، سلولها استوانه‌ای بوده و هسته (N) در سطوح مختلف قرار گرفته است. در زیر سلول اپی تلیال، هسته سلول دار بستی (S) دیده می‌شد. بزرگنمایی ۳۰۰۰۰×



شکل ۱۰: فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته روی ژل ECM: یک لایه سلول استوانه‌ای روی ژل ECM قرار گرفته است هسته (N) سلولها تقریباً در بخش قاعده‌ای سلول واقع شده‌اند. بزرگنمایی ۱۰۰۰۰×

شکل ۱۱: فتومیکروگراف اندومتریوم: یک لایه سلول پوششی استوانه‌ای که روی استرومای رحم واقع شده است داخل استروما سلولهای دارپستی (S) و عروق خونی (BV) دیده می‌شود. بزرگنمایی ۱۰۰۰۰×

۲) تصاویر مقاطع نازک: سلولها همانند حالت *In vivo* روی غشاء پایه بوده و توسط اتصالات محکم و دسموزوم به هم بسته شده‌اند (شکل ۸).

غشاء جانبی سلول در زیر اتصالات سلولی، صاف نبوده، دارای

زوائدی است که با زوائد سلولهای مجاور در هم فرو می‌رود. هسته سلولهای پوششی یوکروماتین بوده و هستک واضحی در داخل آن وجود دارد. سیتوپلاسم سلول حاوی تعداد نسبتاً زیادی میتوکندری است. این ارگانل کروی و بیضی شکل بوده، کریستاهای آن به وضوح مشخص است. میتوکندری‌ها در همهٔ مناطق سیتوپلاسم مشاهده می‌شوند. در داخل سیتوپلاسم مخازن rER نیز مشاهده می‌شود اما واکوئلهای موجود در حالت *In vivo* وجود ندارد (شکل ۷).

بحث

در مطالعه حاضر، سلولهای اپی‌تلیالی اندومتریوم انسان در پاساژ اول، روی ژل ECM کشت شد، تصاویر TEM نشان داد که سلولها، کاملاً قطبی می‌باشند. این اولین گزارش در ارتباط با کشت قطبی سلولهای اپی‌تلیومی رحم انسان با استفاده از سلولهای پاساژ اول است. محققین پیشین (۳، ۱۱) برای کشت قطبی سلولهای اپی‌تلیومی رحم انسان از کشت اولیه استفاده نموده‌اند. این محققین سلولهای اپی‌تلیالی را از بافت جدا نموده، روی ژل ECM کشت دادند، سلولهای فوق به ژل ECM چسبیده و منشاء سلولهای قطبی در کشت اولیه شدند. در مطالعه حاضر، بر خلاف مطالعات قبلی برای کشت قطبی از پاساژ اول استفاده شد بدین ترتیب که سلولهای جدا شده، ابتدا روی پلاستیک کشت شدند، (کشت سلول روی پلاستیک سبب از دست رفتن خصوصیات مرفولوژیک آنها میگردد). سپس سلولها از سطح پلاستیک جدا شده روی ژل ECM کشت شدند. تصاویر میکروسکوپی نشان داد که ژل ECM سبب بازگشت خصوصیات مرفولوژیک به سلول می‌شود.

کشت قطبی سلولهای پوششی رحم انسان در پاساژ اول، با توجه به کمبود بافت رحم انسان و مشکلات تهیه آن، اهمیت فراوانی دارد. با این روش می‌توان با در اختیار داشتن میزان کم بافت رحم، میزان نسبتاً زیادی از سلولهای قطبی تهیه کرد. درتحقیق حاضر میزان سلولهای قطبی تهیه شده چندین برابر سلولهای قطبی تهیه شده با روش Classen و همکاران بوده است. این محققین برای تهیه سلولهای قطبی، به میزان سطح یک Filter Insert به قطر ۱۲ میلیمتر ۲-۵×۱۵cell/ml سلول استفاده شد. در تحقیق حاضر، همان اندازه سلول، ابتدا روی پلاستیک کشت شد، پس از تکثیر، سلولهای فوق از سطح پلاستیک جدا شده، برای کشت قطبی مصرف گردیدند. بدین ترتیب چندین برابر، سلولهای قطبی تهیه شد.

محققین برای رهاسازی سلول اپی‌تلیال از بافت، آنزیمهای مختلفی را بکار می‌برند که از آن جمله می‌توان به آنزیم تریپسین اشاره نمود. این آنزیم ماکرومولکولهای سطح سلول را آسیب می‌زند و در نتیجه چسبیدن سلول به پلاستیک مختل می‌شود. همچنین استفاده از sieve در جداسازی سلولهای اپی‌تلیالی از سایر سلولها، یک روش معمول می‌باشد (۱۱) که از معایب آن می‌توان به پرهزینه بودن آن اشاره نمود. در مطالعه حاضر، برای رهاسازی سلول اپی‌تلیال از بافت، تنها از آنزیم کلاژناز I و برای جداسازی آن از قطعات بافتی از روش unit gravity sedimentation استفاده شد. قبلاً از این روش، Mahfoudi و همکاران برای سلولهای اپی‌تلیالی رحم خوکچه هندی استفاده نموده‌اند (۱۵، ۱۴). نتایج ایمونوسیتوشیمی و مشاهده کشت سلولها با میکروسکوپ معکوس نشان داد که این روش برای سلولهای اپی‌تلیالی انسان نیز کاملاً مؤثر می‌باشد. بطوری که با استفاده از این روش، در محیط کشت میزان سلولهای مرده بحداقل می‌رسد و تقریباً تمام قطعات اپی‌تلیالی به پلاستیک چسبیده و تکثیر می‌یابند. همچنین سلولهای فیبروبلاستی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد.

مطالعات Arnold و همکاران نشان داد، که وجود سلولهای استرومایی برای تمایز اپی‌تلیالی در محیط کشت ضرورت دارد (۱۷). برخی از محققین برای قطبی کردن سلولهای اپی‌تلیالی اندومتریوم انسان، سلولهای استرومایی را در داخل ژل کلاژن کشت دادند سپس لایه نازکی از ژل ECM را بر روی ژل کلاژن ایجاد کردند و سلولهای اپی تلیومی رحم را بر سطح آن کشت دادند (۱۸، ۱۹). در این تحقیق سلولهای اپی‌تلیالی بر روی ژل ECM و بدون حضور سلولهای استرومایی، کشت داده شد. تصاویر TEM نشان داد که سلولها کاملاً قطبی شده‌اند ظاهراً سلولهای استرومایی در قطبی شدن سلولهای اپی‌تلیالی نقش اساسی ایفاء نمی‌کند.

در این تحقیق، سلولهای اپی‌تلیالی بر روی ژل ECM که به نسبت ۱:۴ رقیق شده و در معرض هوا خشک گردیده بود کشت داده شد و تک‌لایه سلولهای قطبی ایجاد گردید. Arnold و همکاران، سلولهای اپی‌تلیالی را بر روی ECM Gel که به نسبت ۱:۸ رقیق شده بود، کشت دادند و مشاهده نمودند که یکسری ساختارهای سه بعدی کروی و لوله‌ای ایجاد شد (۱۷). زمانی که از ECM غلیظ استفاده می‌شود، سلولها به صورت تک‌لایه رشد می‌کنند ولی چنانچه از ECM رقیق استفاده گردد، احتمالاً به‌دلیل قوام سست ژل ECM، تعدادی از سلولهای اپی‌تلیالی بداخل آن نفوذ کرده و در اطراف قطعه‌ای از ژل ECM تجمع نموده، ساختارهای کروی یا لوله‌ای ایجاد می‌نمایند.

سلولهای اپی‌تلیالی رحم به حالت *in vivo* بر روی غشاء پایه قرارگرفته‌اند و نسبت به آن قطبی شده‌اند. جداسازی آنزیمی این سلولها و کشت روی پلاستیک با خذف غشاء پایه سبب از دست رفتن قطبیت سلولها می‌گردد. اتصالات سلولی از بین می‌رود و سلول پهن می‌شود. کشت سلولها روی ژل ECM حاصل از تومور Engel-Breth-Holm swarm غنی از لامینین، سبب قطبی شدن سلول می‌گردد. ژل ECM حاوی ماکرو مولکولهای فراوانی از جمله انتاکتین، کلاژن IV و پروتئوگلیکانهای همپاران سولفات و فاکتورهای رشد TGF-b (Transforming Growth Factor - Beta) و EGF (Epidermal Growth Factor) است. عامل قطبی شدن سلولها عمدتاً ماکرومولکول لامینین است (۲۰، ۲۱).

مقایسه تصاویر سلولهای اپی‌تلیالی کشت شده روی ژل ECM و سلولهای اپی‌تلیالی بافتی نشان می‌دهد که این سلولها شباهت زیادی با هم دارند. هر دو سلول استوانه‌ای بوده و هسته در بخش قاعده‌ای قرار گرفته است. اتصالات محکم و دسموزوم در بخش بالایی غشاء جانبی مشاهده می‌شود. البته تفاوتهایی هم بین دو سلول وجود دارد. هسته سلولهای کشت شده کاملاً یوکروماتینی بوده، درحالی‌که در هسته سلولهای بافتی مناطق هتروکروماتینی دیده می‌شود. در سیتوپلاسم

سلولهای کشت شده، میتوکندری فراوانی در مقایسه با سلولهای بافتی وجود دارد. این تفاوتها را می‌توان به تفاوت بین شرایط کشت و شرایط *in vivo* نسبت داد. یکی از تفاوتهای عمده بین شرایط کشت و شرایط in vivo، حضور نداشتن سلولهای استرومایی در زیر سلولهای اپی تلیومی است. Cunha و همکاران در سال ۱۹۸۵ نشان داده‌اند که سلولهای استرومایی نقش تنظیمی مهمی در رشد و تمایز سلولهای اپی تلیال دارند (۲۲). به نظر می‌رسد که سلولهای اپی تلیومی در کشت روی ژل ECM، بدون حضور سلولهای استرومایی فنوتیپ سلولهای اپی تلیومی را کسب می‌کنند ولی جزئیات فراساختاری سلولهای مبدأ را به دست نمی‌آورند.

مشاهده تصاویر TEM سلولهای کشت یافته روی پلاستیک در روز پنجم کشت اولیه نشان می‌دهد که بخشهای محیطی این سلولها کاملاً نازک بوده و روی بخشهای محیطی سلولهای مجاور قرار می‌گیرد و در بعضی موارد اتصالات شبه دسموزومی برقرار می‌شود. این در حالی است که محققین پیشین معتقد بودند که سلولها پس از کشت بر روی پلاستیک، کاملاً اتصالات محکم و دسموزوم خود را از دست می‌دهند (۱، ۲، ۳، ۵).

در مجموع مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کشت سلولهای پوششی رحم انسان روی پلاستیک باعث از دست رفتن خصوصیات مورفولوژیک سلول می‌گردد اما اگر روی ژل ECM کشت شوند، تا حد زیادی مورفولوژی از دست رفته خود را مجدداً به دست می‌آورد (شکل سلول استوانه‌ای می‌شود، هسته در قاعده قرار می‌گیرد و اتصال محکم بین سلولها برقرار می‌شود).

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان است و محل اجرای بخش عمدهٔ آن در بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدتهای صمیمانه مسئولین محترم پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند.

References

1. Glasser SR, Julian J, Decker GL, Tang JP, Carson DD: Development of morphological and functional polarity in primary cultures of immature rat uterine epithelial cells. J Cell Biol 1988; 107: 2409-2423

2. Jacobs AL, Decker GL, Glasser SR, Julian J, Carson DD: Vectorial secretion of prostaglandins by polarized rodent uterine epithelial cells, Endocrinology. 1990; 126: 2125-2136

3. Schatz F, Gordon RE, Laufer N, Gurpide E: Culture of human endometrial cell under polarizing conditions. Differentiation, 1990, 42: 184-190

4. White TEK, de Sont'Agnes PA, Miller PK: Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple columnar epithelia and glands. *In Vitro* Cell Dev Biol; 1990; 26: 636-642

5. Mani SK, Decker GI, Glasser SR: Hormonal responsiveness by immature rabbit uterine epithelial cell polarized *In vitro*. Endocrinol, 1991; 128: 1563-1573

6. 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

7. Benali R, Dupuit F, Jaqut J, Fucfiey C, Hinnrasky J, Ploton D, and Puchelle E: Growth and characterization of isolated bovine tracheal gland cells in culture. Influence of a reconstituted besement membrane matrix. Biol. Cell; 1999; 66; 263

8. Hootman SR, Logsdon CD: Isolation and monolayer culture of guinea pig pancreatic epithelial cell *In vitro*. Cell Dev Biol 1988; 24, 566

9. Kleinman HK, Mc Garvey ML, Hassel JR, Star VI, Connon FB, Lanric GW, Martin GR: Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry, 1986; 25; 312

10. Negami AI, Tominaga T: Gland and epithelial formation *In vitro* from epithelial cells of the human endometrium. Hum Reprod, 1989; 4, 620

11. Classen L, Mkusche R, Knauteh H, Beier M: Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cell. Cell Tissue Res 1997; 287: 171-185

12. Hadley AM, Djakiew D, Byers SW, Dym M: Polarized secretion of androgen- binding protein and transferring by sertoli cells grown in a bicameral culture system. Endocrinol 1987; 120: 1097-1103

13. Hadley MA, Byers SW, Suarez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M: Extracellular cord formations and germ cell development *In vitro*. Cell Biol, 1985; 101: 1511-1522

14. Mahfoudi A, Fanconnet S, Bride J, Beck L, Remy-Martin JP, Nicollier M, Adessi GL: Serum-free culture of stromal and functionally polarized epithelial cells of guinea-pig endometrium: a potential model for the study of epithelial - stromal paracrine interactions. Biol Cell, 1992; 74: 255-265

15. Mahfoudi A, Nicollier M, Beck L, Mularoni A, Cypriani B, Fanconnect S, Adesst GL: Effect of progestrone on proteins vectorially secreted by glandular epithelial cells of guina pig endometrium: modulation by homologous stroma. J Reprod, Fertil; 1994; 100: 637-644

16. Jacobs AL, Schgal PB, Julian JA, Carson DD: Secretion and hormonal regulation of interleukin - 6 Production by mouse uterine stromal and polarized epithelial cells cultured *in vitro*. Endocrinology; 1992; 131: 1037-1046

17. Julia T, Arnold David G, Kanfman, Seppala M, Bruce A: Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth *In vitro*: a new co-culture model. Hum. Reprod 2001; 16: 836-895

18. Bentin - Ley V, Pedersen B, Lindenberg S, Larsen JF, Ham berger L, Horn T: Isolation and culture of human endometrial cells in a three dimentional culture system. J Reprod Fertil 1994; 101: 327-332

19. Park DW, Choi DS, Ryu HS, Kwon HC, Joo H, Min CK: A well-defind *in vitro* three - dimensional culture of human endomertium and its applicability to endometrial cancer invasion. Cancer Lett. 2003; 195(2): 185-192

20. Steruli CH, Bissell MJ: Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. J. Cell Biol. 1990; 110: 1405-1415

21. Strenli CH, Baikey N, Bissell MJ: Control of mammary epithelial differentiation: basement memberane induces tissue- specific gene expression in the absence of cell - cell interaction and morphologic polarity. J cell Biol 1997; 115: 1383-1395

22. Cunha GR, Bigsby RM, Cooke PS: Stromal epithelial interactions in adult organs: review. Cell Differen. 1985; 17, 137-148