مقاله تحقیقی

فرا ساختار قطبی و غیرقطبی سلولهای پوششی لوله رحم انسان

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد .Ph.D*، مجتبی رضا زاده .Ph.D**، سعید کاظمی آشتیانی .Ph.D*، پویک افتخاری .Ph.D*

*گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

**گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس و گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: آذر ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۸۳

چکیده

هدف: کشت قطبی سلولهای پوششی لوله رحم انسان و بررسی فراساختار سلولهای کشت یافته

مواد و روشها: سلولهای پوششی لوله رحم انسان تهیه شده از بیماران هیسترکتومی به روش آنزیمی جدا و روی ژل ECM (Extracellular Matrix) به حالت قطبی و پلاستیک Polysterene به حالت غیر قطبی کشت شد. ژل ECM یک روز قبل از آغاز کشت قطبی روی فیلتر اینسرت قرار گرفت و در زیر هود استریل خشک شد. ماهیت اپی تلیالی سلولهای کشت شده با روش ایمونوسیتوشیمی تائید شد. پس از اینکه سلولهای کشت شده به مرحله Confluency رسیدند به همراه قطعات بافتی، مراحل مختلف آماده‌سازی میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission) را طی کردند سلولهای قطبی و قطعات بافتی به روش معمول و سلولهای غیر قطبی به روش Flat embedding قالب‌گیری و پس از تهیه برشهای نازک با استات اورانیل و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شدند.

یافته‌ها: سلولهای پوششی کشت یافته بر روی پلاستیک Polysterene در مقایسه با سلولهای بافتی از لحاظ مورفولوژی متفاوت بودند. این سلولها در مقاطع میکروسکوپی دوکی شکل و کشیده ظاهر شدند و بر خلاف حالت *in vivo* اتصال محکم بین آنها بر قرار نبود در حالی‌که سلولهای کشت شده روی ژل ECM همانند سلولهای قطعات بافتی استوانه‌ای شکل و کاملاً قطبی بودند. هسته در این سلولها در بخش قاعده‌ای قرار داشت و در سطح آنها میکرویلی وجود داشت. بین دو سلول مجاور اتصال محکم بر قرار شده بود. اختلاف عمده میان سلولهای کشت یافته بر ژل ECM و سلولهای بافتی در میزان مژه، میزان یوکروماتینی هسته و تعداد میتوکندری و وجود قطرات لیپیدی الکترون دنس بود.

نتیجه‌گیری: کشت سلولهای پوششی لوله رحم انسان بر ژل ECM سبب حفظ قطبیت سلول مشابه با حالت *in vivo* می‌شود ولی به دلیل تأمین نشدن تمام فاکتورهای لازم در محیط کشت، از لحاظ فرا ساختار اختلافاتی بین حالت *in vivo* و *in vitro* این سلولها ظاهر می‌شود.

کلید واژه‌ها: سلولهای پوششی لوله رحم، سلولهای قطبی، فراساختار، سلولهای غیرقطبی

مقدمه

با وجودی که از ابداع کشت سلول قریب به ۱۰۰ سال می‌گذرد، امکان کشت سلولهای پوششی به صورت خالص از حدود ۳۰ سال پیش فراهم آمده است. پیش از آن رشد سلول فیبروبلاستی و غالب شدن بر محیط کشت، از مهمترین مشکلات کشت سلولهای پوششی محسوب می‌شد. برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ Rhinwald و Green با استفاده از محیط بدون سرم و لایه‌ای از سلولهای اشعه دیده موشی[1]، سلولهای پوششی پوست را به صورت خالص (با ممانعت از رشد فیبروبلاست) کشت دادند[۱]. مطالعات بعدی، اهمیت فاکتورهای میتوژن نظیر EGF[2] را در کشت سلولهای پوششی نشان داد و پس از آن انواعی از سلولهای پوششی بدون آلودگی

آدرس مکاتبه : تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی
صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ Email:info@royaninstitute.org

1. Irradiated mouse
2. Epidermol Growth Factor

به سلول فیبروبلاست کشت شد. [۲]. کشت خالص سلولهای پوششی موفقیت بزرگی محسوب می‌شد ولی مطالعه مکانیسم‌های سلولی در محیط کشت امکان‌پذیر نبود. زیرا سلولهای پوششی پس از جدا شدن از بافت و کشت روی ظروف پلاستیکی، مهمترین ویژگی خود یعنی قطبیت ساختاری و عملکرد تمایز یافته را از دست می‌دادند [۷-۳] و فنوتیپ سلول تغییر می‌کرد. این سلولها در مقایسه با سلولهای بافت مبدأ، از لحاظ مورفولوژی و عملکرد متفاوت بوده سیستم مناسبی برای مطالعه رفتار سلولی محسوب نمی‌شد.

با انجام مطالعاتی در این زمینه، علل از دست رفتن قطبیت ساختاری سلول پوششی در محیط کشت مشخص شد [۱۱-۸] و با فراهم آوردن شرایط لازم (استفاده از ماده خارج سلولی) انواعی از سلولهای پوششی از جمله سلولهای پوششی تیروئید [۱۲]، نای گاو [۱۳]، مجرای پانکراتیک [۱۴]، رحم [۹ و ۱۷-۱۵] و سلولهای سرتولی موش صحرایی [۱۸] به حالت قطبی کشت شد. در این میان کشت قطبی سلولهای پوششی لوله رحم نیز مورد توجه قرار گرفت. به‌طوری که جشی (Joshi) در سال ۱۹۹۵ لایه‌ای از ماده خارج سلولی مصنوعی با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه کرد و سلولهای پوششی لوله رحم گاو را روی آن کشت داد و مشاهده کرد سلولهای فوق به شکل لوله و اجسام کروی توخالی رشد می‌کنند این محقق سلولهای پوششی فوق را روی ماده خارج سلولی با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر کشت داد این بار تک لایه‌ای از سلولهای پوششی ایجاد شد. مطالعات فراساختاری نشان داد که سلولهای کشت یافته مکعبی تا استوانه‌ای شکل بوده و به میزان خیلی اندک مژک دارند [۱۹]. همچنین توماس (Thomas) و همکاران (۱۹۹۵) سلولهای پوششی لوله رحم اسب را روی ماده خارج سلولی کشت دادند و پروتئین‌های ترشحی و مورفولوژی سلولها را بررسی کردند [۲۰]. براساس نتایج حاصل سلولهای کشت شده ظاهری قطبی داشته و پروتئین‌های ترشحی آنها در مقایسه با سلولهای کشت شده روی پلاستیک متفاوت بود. در این ارتباط Pollard و همکاران نیز با کشت سلولهای پوششی لوله رحم گاو بر روی ژل ECM به بررسی تأثیر آن در بهبود حرکت و ظرفیت لقاح اسپرم پرداخته‌اند[۲۱]. اما در مورد کشت قطبی سلولهای پوششی لوله رحم انسان گزارشها نادر بوده و در این ارتباط می‌توان به مطالعهٔ Elington و همکاران اشاره نمود. این محققین با کشت سلولهای پوششی لوله رحم انسان روی مادهٔ خارج سلولی و قرار دادن اسپرم روی آن به تعامل این دو سلول پرداخته‌اند [۲۲]. در مطالعه فوق، فراساختار سلولهای کشت یافته مورد توجه قرار نگرفته است؛ به‌همین‌دلیل مطالعهٔ حاضر سعی دارد با کشت قطبی و غیرقطبی سلولهای پوششی لوله رحم انسان، فراساختار آنها را بررسی نماید.

مواد و روشها

نمونه

سلولهای پوششی لوله رحم با مراجعه به بیمارستانهای آرش و امام خمینی تهران و از بیمارانی که به دلیل ضایعه در رحم تحت عمل هیسترکتومی کامل واقع می‌شدند، تهیه شد. با هماهنگی‌های به عمل آمده با مسئول اتاق عمل، رضایت بیمار مبنی بر استفاده از بافت‌های آنها در کار تحقیقاتی اخذ شد. نمونه‌ها از زنان در سن پیش از یائسگی دریافت شد. در اتاق عمل بیمارستان، لوله رحم بلافاصله پس از عمل داخل لوله محتوی HBSS[1] عاری از یون کلسیم و منیزیوم قرار گرفت و به آزمایشگاه کشت رویان انتقال یافت.

جداسازی سلول

در این ارتباط، روش Dickens و همکاران استفاده شد [۲۳]. ابتدا نمونه‌ها با محیط HBSS عاری از یون کلسیم و منیزیم شسته شد و سروز اطراف جدا شد. سپس یک برش در امتداد طول لوله رحم ایجاد شد تا اپی تلیوم آن نمایان شود. بافت عضلانی تا حد امکان از مخاط جدا و مخاط به قطعات یک سانتیمتری تقسیم شد و در HBSS محتوی ۰/۵ درصد ترپسین نوع I (Sigma, USA) به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتیگراد و یک ساعت در حرارت اتاق انکوبه شد. پس از آن آنزیم با HBSS تازه جایگزین و به مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سلولی حاصل پس از دوبار سانتریفوژ، با ۳ میلی لیتر محیط (Dulbeco's Modified Eagls

1. Hanlkes Balanced Salt Solution

medium/HAM F12, Sigma, USA) DMEM/HAM F12 حاوی ۱۰ درصد سرم FCS (Fetal Bovine Serum, Gibco, Denmark) به صورت سوسپانسیون در آمد. توان زیستی سلولها با استفاده از رنگ حیاتی ۰/۴ درصد تریپان‌بلو بررسی شد ۹۰ درصد سلولها زنده بودند.

کشت سلول

با استفاده از لام نئوبار، شمارش سلول انجام گرفت و سلولها با غلظت 6×10^5 سلول در میلی لیتر بر سطح پلاستیک Polysterene ظروف کشت فالکون (به حالت غیر قطبی) و ژل ECM (قطبی) کشت شدند. ژل ECM یک روز قبل از کشت آماده شد؛ بدین ترتیب که به نسبت یک به چهار با محیط DMEM/HAM'S F12 رقیق و لایهٔ نازکی از آن روی Millicell Culture plate insert با سوراخهای ۰/۴ میکرومتر و قطر ۱۲ میلی متر ایجاد شد و تحت شرایط استریل، در معرض هوا خشک شد. در روز کشت، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت داخل چاهک پلیت ۱۲ چاهکی ریخته شد و Insert پوشیده با ژل ECM داخل آن قرار گرفت و ۰/۱ میلی لیتر محیط حاوی سلولهای پوششی به آن اضافه شد. به موازات کشت قطبی، سلولهای پوششی به حالت غیر قطبی نیز (در پلیتهای ۱۲ چاهکی) کشت و هر دو کشت قطبی و غیرقطبی در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد Co_2 انکوبه شدند. محیط مصرفی سلولها DMEM/HAM'S F12 بدون فنول رد حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Retinoic Acid (Sigma, USA)، ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر EGF (Epidermal Growth Factor, Sigma, USA) و ۱۰ میلی‌لیتر در میلی‌لیتر ترانسفرین (Sigma, USA) و ۵ درصد FCS بود. محیط سلولها هر دو روز یک بار عوض شد.

ایمونوهیستوشیمی

برای تأیید ماهیت اپی تلیالی سلولها و اطمینان از درستی روش جداسازی سلول از بافت، تکنیک رنگ‌آمیزی ایمنی به کار برده شد برای این منظور از Dako Envision+system Peroxidase (Dako, Holland) استفاده شد. آنتی بادی مورد استفاده آنتی سایتو کراتین ۷ بود. این نوع سایتو کراتین در سلولهای پوششی لوله رحم و رحم وجود دارد. از اپی‌تلیوم بافت اندومتریوم و سلولهای کشت یافته به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد (شکل ۱). آنتی بادی با بافر ۰/۰۵ مولار Tris-HCL به نسبت‌های، مختلف رقیق شده و پس از چندبار رنگ‌آمیزی رقت یک به پانزده انتخاب شد. برای رنگ‌آمیزی، ابتدا با استفاده از Peroxidase block (به مدت ۵ دقیقه) پراکسید داخلی خنثی و سپس آنتی‌بادی (به مدت نیم ساعت) اضافه شد. پس از آن سلولها در معرض پلی‌مر نشان‌دار شده با پراکسیداز به مدت ۸ دقیقه قرار گرفتند و در انتها ماده substrate-chromogen به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد که در اثر این ماده در محل سایتو کراتین ۷ رسوب قهوه‌ای ایجاد شد. از هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها استفاده شد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره

برای آماده‌سازی بافت لوله رحم، ابتدا قطعات یک میلی‌متری مخاط با استفاده از محلول کارنوفسکی (۱/۵ ساعت) و اسمیوم (۱ ساعت) به ترتیب تثبیت اولیه و ثانویه شدند. سپس برای آبگیری از درجات مختلف اتانول استفاده شد. آغشتگی با مخلوط رزین و استون انجام پذیرفت. پس از آن نمونه‌ها با استفاده از رزین آرالدیت قالب‌گیری شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه و ۱۸-۱۷ ساعت در دمای ۶۰ درجه قرار داده شدند. به منظور بررسی فراساختار سلولهای غیر قطبی، ابتدا این سلولها روی لامل کشت شدند و در روز هفتم کشت، به همراه سوبسترا مراحل مختلف پردازش بافتی را طی کردند. برای قالب‌گیری از تکنیک flat embedding استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا قالبها با رزین آرالدیت پر شدند و سپس لامل به همراه سلولهای سطح آن، روی قالب قرار گرفت و در دمای ۴۵ درجه (۲۴ ساعت) و ۶۰ درجه (۱۷ ساعت) انکوبه و در پایان لامل از سطح رزین جدا شد و سلولها در داخل آن باقی ماندند. برای مطالعه فراساختار سلولهای قطبی، از روز هفتم کشت استفاده شد. به این ترتیب که محیط کشت داخل Insert و چاهک پلیت خارج گردید و محلول کارنوفسکی در حالی‌که

Insert داخل چاهک بود برای تثبیت اولیه اضافه شد (۱/۵ ساعت) پس از آن تثبیت ثانویه با اسمیوم ۱ درصد انجام گرفت (۱ ساعت) و آنگاه ژل سطح Insert تکه تکه شد و بقیه مراحل مطابق با روش ذکر شده برای بافت ادامه یافت.

یافته‌ها

کشت سلول

جداکردن سلولهای پوششی لوله رحم به روش آنزیمی، به تعدادی از سلولها آسیب می‌زند. این قضیه در رنگ‌آمیزی حیاتی، به خوبی مشخص بود. با این رنگ‌آمیزی، رنگ وارد سلولهای مرده شده در حالی‌که سلولهای زنده به صورت فعال از ورود رنگ به داخل سیتوپلاسم جلوگیری نمودند؛ با این روش حدود ۱۰ درصد سلولها از بین رفتند. روش دیگر برای مشخص کردن زنده یا مرده بودن سلول، مشاهده آنها در زیر میکروسکوپ نوری بود. حرکت مژک موید زنده بودن آن بود. در کشت اولیه، پس از یک روز تعدادی از سلولهای به کف پلاستیک چسبیده، منشاء کشت اولیه شدند و سلولهای که توانایی برقراری اتصال نداشتند در اولین تعویض محیط کشت دور ریخته شدند. پس از گذشت ۴-۳ روز جزایر کوچکی از سلولهای نسبتاً کشیده ظاهر شد (شکل ۲،c). این جزایر طی چند روز آینده بزرگتر شده و از فاصلهٔ آنها کاسته شد و پس از ۷ روز ظرف کشت پر شد.

در کشت سلول بر ژل ECM، برخی از سلولها به سطح ژل ECM چسبیده و تعدادی دیگر قادر به برقراری اتصال با آن نبوده در محیط کشت شناور شدند و با تعویض محیط کشت دور ریخته شدند. در ۴۸ ساعت اول کشت روی ژل، باید دقت کرد که فیلتر Insert بی حرکت باشد. برقراری اتصال بین سلولهای پوششی و ژل به آرامی صورت گرفته طی دو روز کامل می‌شود. اگر قبل از این مدت فیلترها حرکت کنند، اتصالات بین سلولها و سطح ژل از هم گسیخته شده، سلولها رها می‌شوند. از طرف دیگر؛ سلولهایی که به سطح ژل متصل می‌شوند توان میتوزی خود را باز یافته، تکثیر را آغاز می‌نمایند که در اثر آن جزایر سلولی ایجاد می‌شود.(شکل ۳،a) سلولهای کشت شده روی ژل، سطح مقطع کوچک و گردی داشته و فاصله‌ای بین آنها دیده نشد. جزایر ایجاد شده به ورقه‌های اپی تلیال شباهت داشت. کشت روی ژل ECM پس از ۱۲-۱۰ روز به مرحله Confluency رسید.

ایمونوهیستوشیمی

رسوب قهوه‌ای رنگ در سیتوپلاسم سلولهای پوششی به عنوان شاخص وجود سایتوکراتین تأئیدی بر ماهیت اپی تلیالی سلولها بود (شکل ۱).

فراساختار سلولهای پوششی بافتی

تصاویر مقاطع نیمه نازک نشان داد که سلولهای پوششی لوله رحم در حالت *in vivo* از یک لایه سلول استوانه‌ای متراکم متشکل از دو نوع سلول تیره و روشن تشکیل شده است (شکل ۲،a). در سلولهای روشن، سطح آزاد دارای میکروویلی بوده و در سلول تیره، این سطح مژک داشت. هسته در این دو نوع سلول بیضی شکل بوده و نسبت به هم در سطوح مختلف سیتوپلاسم قرار گرفته بود. در سلولهای روشن، هسته عموماً در بخش قاعده‌ای و در نوع تیره، هسته در مرکز و متمایل به نیمه رأسی سلول واقع شده بود. در زیر تک لایه سلولهای پوششی، بافت همبندی حاوی سلولهای فیبروبلاستی و عروق خونی حضور داشت. در تصاویر مقاطع ظریف جزئیات بیشتری قابل مشاهده بود. بین دو سلول پوششی مجاور فاصله زیادی وجود نداشت و بین آنها در بخش بالایی غشای جانبی اتصال محکم، دسموزوم و زونولا ادهرنس برقرار بود. سلولهای فوق از ناحیه غشای قاعده‌ای روی غشای پایه واقع بودند. در مجاور بخش قاعده‌ای سلولهای استوانه‌ای، سلول کوچک و نسبتاً کروی شکل دیده شد. این سلول تیره رنگ بوده، سطح آن به بیرون باز نمی‌شد. بین سلولهای استوانه‌ای و این سلول کروی کمپلس اتصالی مشاهده نشد (شکل ۲،b).

هسته سلول تیره، بیضی شکل بوده، در قسمت مرکزی آن سلول واقع بود. در زیر هسته یک واکوئل بزرگ که سبب فرورفتگی هسته شده بود، مشاهده شد. لایه‌ای از هتروکروماتین در زیر پوشش هسته واقع بوده و قسمت مرکزی هسته عموماً یوکروماتین با مناطق پراکنده‌ای از هتروکروماتین بود.

سیتوپلاسم سلول الکترون دنس بوده، تعداد زیادی میتوکندری داشت. میتوکندری‌ها در زیر غشای رأسی، در ناحیه قاعده‌ای و اطراف هسته پراکنده بودند و لا به لای آنها، مخازن rER[1] وجود داشت. هسته سلولهای روشن از نظر مناطق هتروکروماتینی مشابه سلولهای تیره بوده و سیتوپلاسم آن در مقایسه، مخازن rER بیشتری داشت.

فراساختار سلولهای کشت شده روی پلاستیک

تصاویر مقاطع نیمه نازک نشان داد که سلولهای پوششی لوله رحم پس از کشت روی پلاستیک، شکل استوانه‌ای خود را از دست داده، کم ارتفاع و پهن می‌شوند. در مقاطع تهیه شده، این سلولها دوکی شکل با هسته‌ای درشت و بیضی ظاهر شدند هسته در ضخیم‌ترین بخش سلول واقع بوده، قسمت اعظم آن را اشغال می‌کرد. در دو طرف هسته، سلول به شکل نوار باریکی به طرفین امتداد می‌یافت(شکل ۲،c). تصاویر مقاطع ظریف، خصوصیات فراساختاری سلول را بیشتر مشخص نمود. براساس این تصاویر، سلولهای کشت یافته بر خلاف حالت *in vivo* در سطح خود میکروویلی و یا مژه نداشته، به صورت پراکنده زواید کوتاه و نسبتاً ضخیم استوانه‌ای داشتند (شکل ۲،d). همچنین بین سلولها، اتصال محکم برقرار نبوده، امتداد سلولها روی هم قرار گرفته، در مناطقی اتصالاتی شبیه دسموزوم داشتند (شکل ۲،e). در برخی مقاطع امتداد سلولها در بیش از دو طبقه واقع بود. هسته سلولها کشیده و باریک بوده و کروماتین آن یکنواخت بود و فرورفتگی‌هایی عمیق در آن وجود داشت (شکل ۲،f). سیتوپلاسم در مجموع الکترون دنس و کم ارگانل بوده، چندین واکوئل بزرگ با محتویات الکترون دنس به شکل اسفنج در آن قابل مشاهده بود.

فراساختار سلولهای کشت شده روی ژل ECM

براساس تصاویر مقاطع نیمه نازک، سلولهای پوششی لوله رحم به هنگام کشت روی ژل ECM همانند حالت *in vivo* به شکل تک لایه‌ای از سلولهای استوانه‌ای متراکم با میکروویلی در سطح آزاد رشد یافتند (شکل ۳،a). سلولهای پوششی در حالت *in vivo* روی زمینه‌ای متشکل از بافت همبندی واقع بوده، در حالی‌که سلولهای کشت شده روی زمینه‌ای از ژل ECM قرار داشتند (شکل ۳،b). مشاهده تصاویر مقاطع ظریف بیانگر آن بود که همانند حالت *in vivo* بین سلولهای استوانه‌ای کمپلکس اتصالی برقرار بوده (شکل ۳،c) و لایه‌ای از غشای پایه در زیر آنها تشکیل شده است (شکل ۳،d). همچنین در سطح سلول میزان زیادی میکروویلی وجود داشته، اما مژک به ندرت قابل مشاهده بود (شکل ۳،b,e). هسته سلولهای کشت یافته تقریباً کروی بوده، کروماتینی یکنواخت داشتند. محل هسته در بخش مرکزی سلول و تا حدی متمایل به نیمه پایینی آن بود. در داخل سیتوپلاسم و در بالای هسته یک دستگاه گلژی بزرگ به چشم می‌خورد و بالاتر ازآن چند قطره چربی الکترون دنس قرار گرفته بود (شکل ۳،f). این قطرات در زیر هسته نیز وجود داشت. اندامکهای دیگر سیتوپلاسم شامل میتوکندری ریز کروی و بیضی شکل با کریستاهای کاملاً واضح بود. در لابه لای میتوکندری‌ها مخازن نسبتاً وسیع rER وجود داشت. در بخش راسی سلول در بعضی مقاطع گرانولهای ترشحی حاوی مواد الکترون لوسنت قابل مشاهده بود (شکل ۳،c).

بحث

سلولهای پوششی لوله رحم، قطبی شده در محیط کشت از لحاظ استفاده در سیستم‌های هم کشتی اهمیت فراوانی دارند، به‌طوری که چندین مطالعه به این موضوع پرداخته و نتایج بیانگر عملکرد متفاوت این سلولها در سیستم‌های هم کشتی است. در حالی‌که برخی از محققین وجود سلولهای قطبی را در سیستم هم کشتی مثبت گزارش کرده‌اند [۲۱ و ۲۲] برخی دیگر آنها را بی‌تأثیر عنوان نموده‌اند [۲۴]. با توجه به اینکه عملکرد هر سلول ارتباط تنگاتنگی با ساختار آن دارد، مطالعهٔ فراساختار سلولهای قطبی شده اهمیت فراوانی پیدا می‌کند. این در حالی است که گزارش در ارتباط با مورفولوژی سلولهای قطبی شده پوششی لوله رحم انسان وجود ندارد. در مطالعه حاضر فراساختار این سلولها بررسی شد و نتایج نشان داد که سلولهای قطبی شده لوله رحم شباهت زیادی به سلولهای بافتی داشته و در مقایسه با سلولهای کشت شده روی پلاستیک کاملاً

1. Rough endoplasmic Reticulum

متفاوتند.

قطبیت یکی از ویژگیهای مهم سلولهای پوششی بوده و نوعی عدم تقارن در ساختار سلول محسوب می‌شود. این عدم تقارن در غشای سلول به صورت اختلاف در ترکیبات پروتئینی و لیپیدی نواحی مختلف آن تجلی پیدا می‌کند [۲۵] و در سطح سلولی و فراساختاری به صورت کاهش فاصله دو سلول مجاور، قرارگرفتن هسته در قاعده سلول و ظاهر شدن میکروویلی در سطح آزاد سلول ظهور پیدا می‌کند. اعتقاد براین است که اتصال محکم در سلول قطبی با جلوگیری از مخلوط شدن پروتئین‌های اختصاصی نواحی مختلف غشای سلولی سبب تداوم قطبیت دو سلول پوششی می‌شود [۲۶]. در مطالعه حاضر، با توجه به فرا ساختار سلول (تشکیل اتصال محکم، کاهش فاصله دو سلول مجاور، استقرار قاعده‌ای هسته و تشکیل میکروویلی) قطبی شدن سلولهای پوششی رحم بر روی ژل ECM تأیید شد. اما ارزیابی فراساختاری تنها روش ارزیابی قطبیت سلول نبوده، محققین روشهای دیگری را نیز به‌کار برده‌اند. Dickens و همکاران در سال ۱۹۹۶ سلولهای پوششی لوله رحم انسان را روی ماده خارج سلولی کشت داده، قطبیت آنها را با روش الکتروفیزیولوژی و بررسی متابولیسم در بخش‌های مختلف سلول ارزیابی کردند [۲۳]. بر اساس این مطالعات اختلاف پتانسیل ایجاد شده بین دو سمت اپی تلیوم، بالا بودن مصرف گلوکز و تولید لاکتات در سمت قاعده‌ای سلول نشانه‌های قطبی بودن است. برخی محققین ارزیابی بیوشیمیایی را ترجیح داده‌اند و در این ارتباط از تفاوت ترکیبات بیوشیمیایی غشاهای قاعده‌ای-جانبی و رأسی سود برده‌اند. این محققین تفاوتهای فوق را با استفاده از آنتی بادی‌های ویژه به اثبات رسانده‌اند [۲۷].

مطالعات فراساختاری تحقیق حاضر نشان داد که سلولهای پوششی لوله رحم در زمان کشت بر ژل ECM (کشت قطبی) از نظر فراساختار شباهت زیادی به سلولهای بافتی دارد به‌طوری که هر دو سلول استوانه‌ای بوده، هسته در قاعده سلول واقع شده، اتصالات محکم و دسموزوم در بخش بالایی غشای جانبی تشکیل شده، در زیر هر دو سلول غشای پایه واقع بوده و در سطح هر دو میکروویلی وجود دارد. مهمترین اختلاف میزان سلولهای مژه‌دار و تعداد مژه‌ها بود. در حالی‌که این نوع سلول در حالت *in vivo* به وفور وجود داشت، در کشت روی ژل تعداد آنها بسیار اندک بود و مژه به ندرت در سطح سلول مشاهده شد. محققین معتقدند که منشاء سلولهای مژه‌دار در لوله رحم، سلولهای ترشحی است. این فرضیه با مشاهده سلولهایی که به طور هم زمان وزیکولهای ترشحی و اجزاء مژه‌زایی داشتند، ابراز شده است [۲۸]. از طرفی مطالعه Comer و همکاران یکی از عوامل القاءکننده مژه‌زایی در محیط کشت را مشخص کرده است. بر اساس این تحقیق وجود استرادیول در محیط کشت سبب القاء بیان آنتی ژن LHS28 و آغاز فرآیند مژه‌زایی می‌شود. در مطالعه فوق با افزودن استرادیول به محیط کشت حدود ۱/۳ سلولها مژه‌دار شدند [۲۹]. وجود سلولهای مژه‌دار به تعداد اندک در کار حاضر نشانگر این است که ژل ECM به تنهایی قادر به القای فرآیند مژه‌زایی در سطح وسیع نبوده و برای این منظور وجود عوامل هورمونی ضرورت دارد.

سلولهای کشت یافته قطبی و سلولهای بافتی، از لحاظ وضعیت کروماتین هسته و میزان میتوکندری و قطرات چربی نیز با یکدیگر اختلاف داشتند. هسته سلولهای کشت شده کاملاً یوکروماتین بوده در حالی‌که هسته سلولهای بافتی مناطق هتروکروماتینی داشت. علاوه‌براین؛ میزان میتوکندری در سیتوپلاسم سلول کشت یافته قطبی بیش از سلولهای بافتی بود و قطرات چربی الکترون دنس در سلولهای بافتی مشاهده نشد. به نظر می‌رسد علت این تفاوتهای فراساختاری میان سلولهای کشت یافته روی ژل ECM و سلولهای بافتی، تفاوت بین شرایط کشت و شرایط *in vivo* باشد. در حالت *in vivo* سلولهای پوششی روی داربستی از سلولهای استرومایی واقع بوده و مطالعات نشان می‌دهد که رسپتور هورمونهای استرادیول و پروژسترون بر روی سلولهای استرومایی واقع بوده و تأثیرات این هورمونها به واسطه این سلولها به سلولهای پوششی می‌رسد و تمایز و عملکرد آنها را تنظیم می‌نماید [۳۱ و ۳۲]. فقدان سلولهای استرومایی و عوامل هورمونی در محیط کشت سلولهای پوششی لوله رحمی مطالعه حاضر، می‌تواند علت این اختلافات فراساختاری باشد. به نظر می‌رسد که سلولهای اپی تلیال در کشت بر ژل ECM بدون حضور سلولهای

استروماییی و عوامل هورمونی فتوتیپ سلولهای اپی‌تلیالی را کسب می‌نماید ولی جزئیات فراساختاری سلولهای مبدأ را به‌دست نمی‌آورد.

در مطالعه حاضر برای اثبات ماهیت اپی‌تلیالی سلولها در زمان کشت روی پلاستیک از آنتی سایتوکراتین ۷ استفاده شد. سلولهایی که رسوب قهوه‌ای رنگ در محل سایتوکراتین آنها ایجاد شد به عنوان سلول پوششی در نظر گرفته شدند. اما در ارتباط با سلولهای کشت شده روی ژل ECM نوع رفتار سلول نسبت به ژل، ماهیت اپی تلیال یا فیبروبلاستی آن را مشخص نمود. سلول بر اساس آنچه در حالت *in vivo* تجربه کرده است، در سطح یا داخل مادهٔ خارج سلولی استقرار یافت. سلولهای پوششی در سطح ژل آرایش پیدا کرده و سلول فیبروبلاستی در داخل آن قرار گرفتند (شکل ۳،d).

سلولهای پوششی لوله رحم انسان، زمانی که بر روی پلاستیک کشت می‌شوند، خصوصیات مورفولوژیک را از دست داده به شکل سلولی پهن و کشیده با چند زایده انگشتی شکل در سطح و هسته‌ای نسبتاً درشت و سیتوپلاسمی اندک و کم ارگانل ظاهر می‌شوند و در عین حال برخی ویژگیهای سلول پوششی در آنها حفظ می‌شود که از آن جمله می‌توان به سایتوکراتین مشابه در هر دو سلول اشاره کرد. سایتوکراتین اختصاصی سلولهای پوششی لوله رحم سایتوکراتین ۷ است که در سلولهای کشت شده روی پلاستیک کاملاً حفظ می‌شود. از طرفی سلولهای پوششی لوله رحم این قابلیت را دارد که با کشت روی ژل ECM بسیاری از خصوصیات مورفولوژیک خود را حفظ نماید. با این وجود جزئیات فرا ساختاری میان سلولهای کشت یافته بر روی ژل ECM و سلولهای بافتی متفاوت است که علت آن احتمالاً تأمین نشدن القائات پاراکرینی در اثر برهم‌کنشهای هترولوگ برای تمایز کامل سلول پوششی است. به هر حال کشت سلولهای پوششی لوله رحم بر روی ژل ECM یک سیستم ارزشمند برای مطالعات بیولوژی سلول پوششی، عوامل تمایز سلول پوششی و تحقیقات مربوط به عملکردهای سلولهای متمایز است.

تقدیر و تشکر

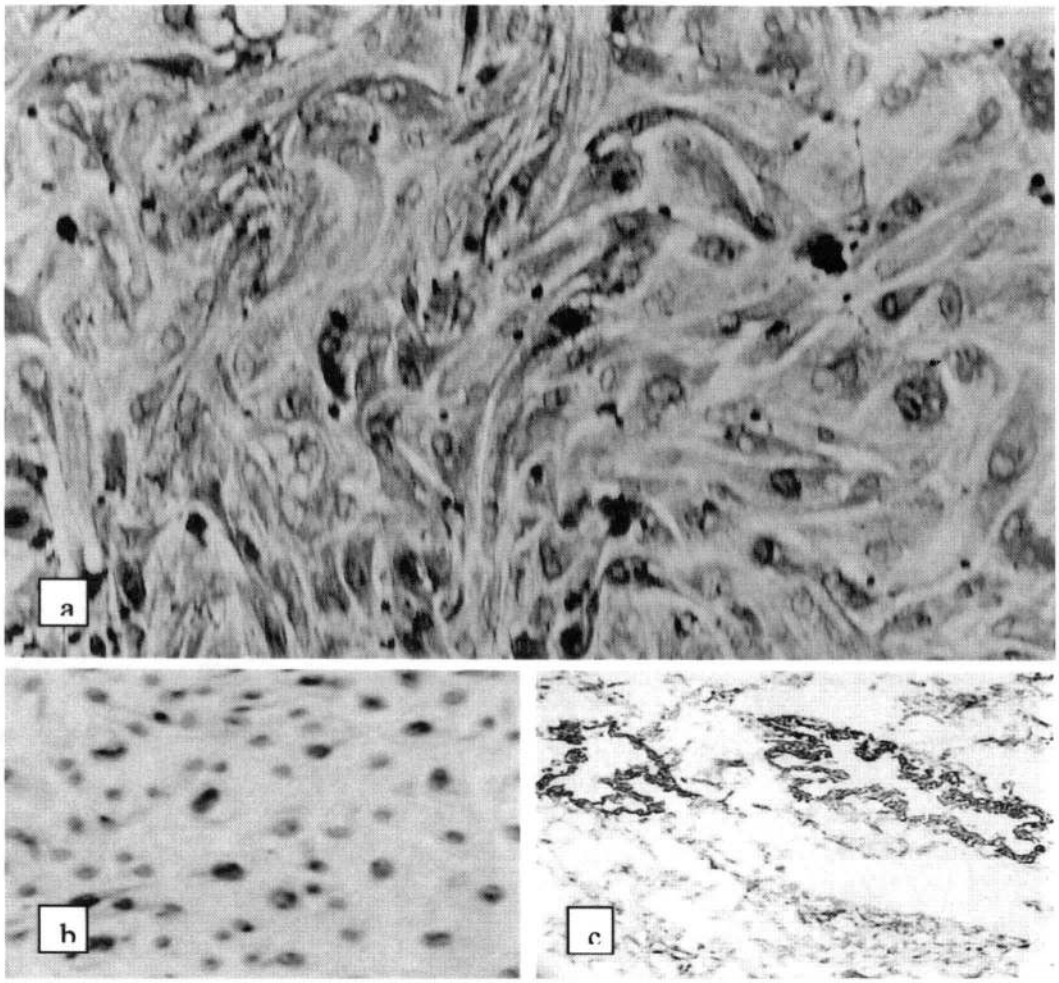
مطالعه حاضر، طرح مصوب پژوهشکده رویان (کد ۲-۲۲۹) بوده و محل اجرای آن نیز در بخش تحقیقات این پژوهشکده و مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشگاه شهید بهشتی بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدتهای صمیمانه هر دو مرکز ابراز می‌دارند.

References

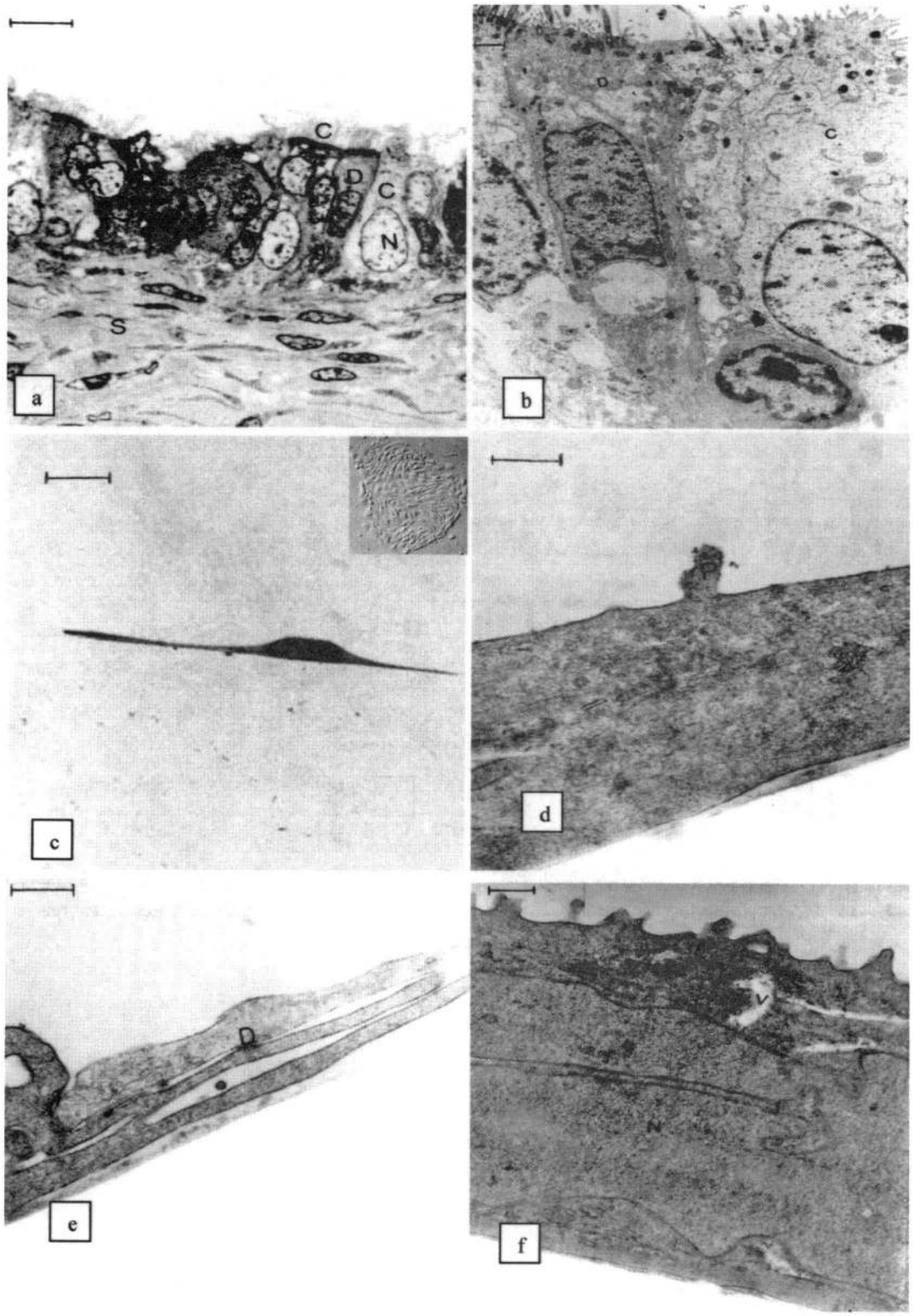
1. **Rheinwald JG, Green H.** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinooytes: The formation of keratinizing colonies from single Cell. 1977; 265: 421-4.
2. **Rheinwald JG.** In cell growth and division: a practical approach. IRL Press oxford 1989: PP. 81-94.
3. **Glasser SR, Julian J, Decker GL, Tang JP, Carsen DD.** Development of morphological and functional polarity in primary cultures of immature rat uterine epithelial cells. J Cell Biol 1988; 107: 2409-23.
4. **Jacobs AL, Decker GL, Glasser SR, julian J, Carsen DD.** Vectorial secretion of prostaglandins by polarized rodent uterine epithelial cells. Endocrinology 1990; 126: 2125-36.
5. **Schatz F, Gorden RE, Lanfer N, Gurpide E.** Culture of human epithelial cells under polarizing conditions. Differentiation 1990; 42: 184-90.
6. **White TE, disant, Agnese PA, Miller PK.** Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple Columnar epithelia and glands. In vitro cell Dev Biol 1990; 26: 636-420.
7. **Mani SK, Decker GL, Glasser SR.** Hormonal Responsiveness by immature rabbit uterine epithelial cells polarized in vitro Endocrinology 1991; 128: 1563-73.
8. **Ailenberg M, Fritz IB.** Control at levels of plasminogen activator activity secreted by sertoli cells maintained in a two-chamber assembly. Endocrinology 1988; 12: 2613-8.
9. **Carson DD, Tang J-P, Julian J, Glasser SR.** Vectorial secretion of proteoglycans by polarized rat uterine epithelial cells. J Cell Biol 1988; 197: 2425-34.
10. **Chembard M, Verrier B, Gabrion J, Maunchamp J.** polarization of thyroid cells in culture: evidence for basolateral localization of the iodide "pump" at the

thyroid stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex. J Cell Biol 1983; 96: 1172-7.

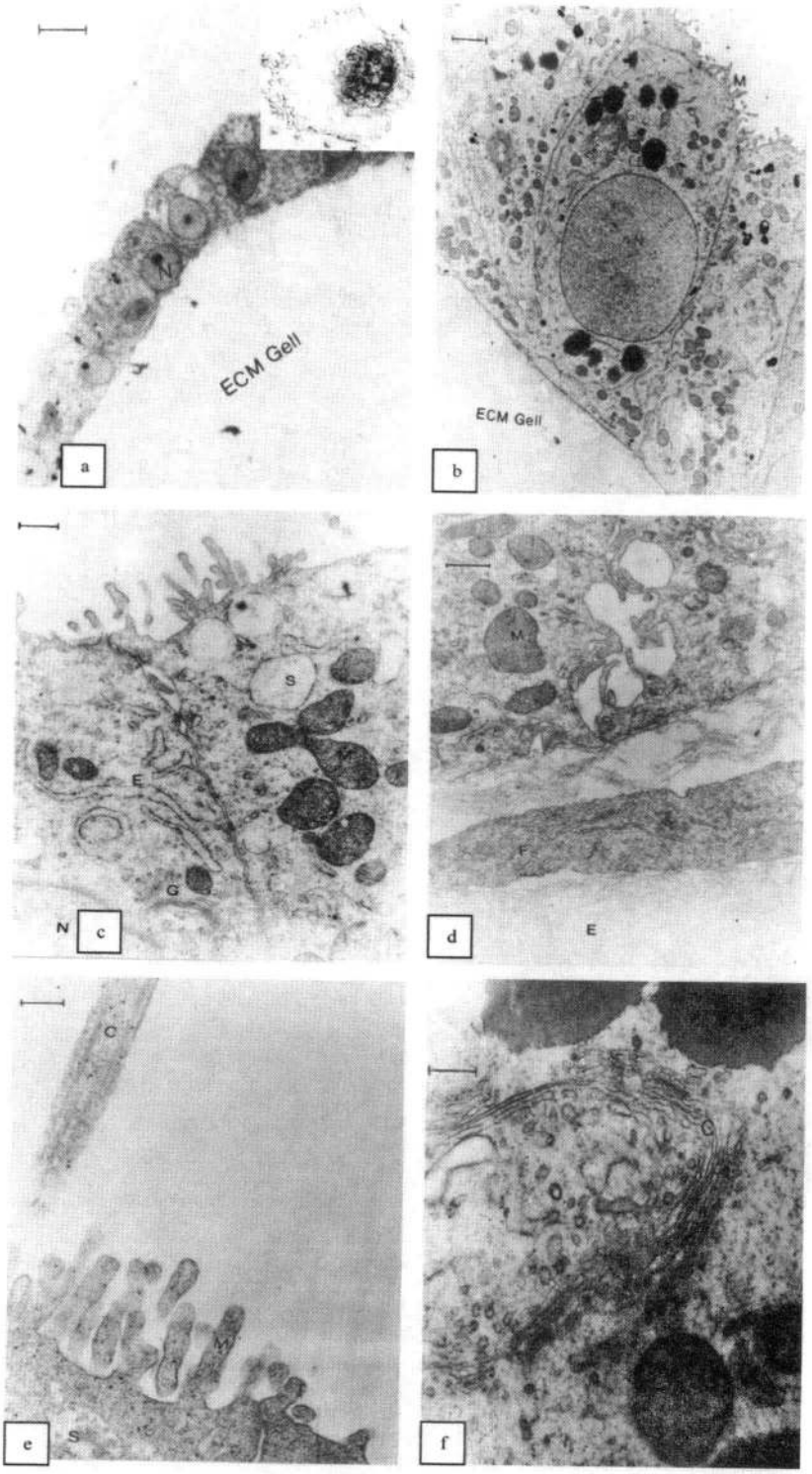
11. **Hardley MA, Byers SW, Snarez-Quarez-Quian CA, Kleinman HA, Dym M.** Extracellular matrix regulates sertoil cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro, J Cell Biol 1985; 101: 1511-22.
12. **Chambard M, Cambion J, Manchamps J.** Influence of collagen gell on the orientation of epithelial cell polarity in follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers J Cell Biol 1981; 91-157.
13. **Benali R, Dupuit F, Jaquty J, Fucfiey C, Hinnrasky J, Ploton D, Puchelle E.** Growth and characterizatoin of isolated bovine tracheal gland cells in Culture. Influence of veconstituted basement membrane matrix. Biol Cell 1989; 66: 263-70.
14. **Hootman SR, Logsdon CD.** Isolation and monolayer culture of guinea Pig pancreatic epithelial cells in vitro. Cell Dev Biol 1988; 24: 566-74.
15. **Negami AL, Tominaga T.** Gland and epithelial formation in vitro from epithelial cells of the human endometrium. Hum Reprod. 1989; 4: 620-26.
16. **Bentin-Ley U, Pederson B, Linderberg S, Larsen JB, Hamberger L, Horn T.** Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. J Reprod Fertil 1994; 161: 327-35.
17. **Classen-Linke I, Ku sche M, Knauthe R, Beier HM.** Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of it's polarized hormone responsive epithelial cells. Cell Tissne Res 1977; 284: 171-85.
18. **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. Endocrinology 1987; 120: 1097-103.
19. **Joshi MS.** Growth and differentiation of the cultured cells of the cow oviduct on reconstituted basement membrane. J Exp Zool 1995; 260: 229-38.
20. **Thomas PG, Ignotz GG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Currie B.** Isolation, culture and characterization of equine oviduct epithelial cells in vitro. Mol Reprod DEV 1995; 41: 468-78.
21. **Ellington JE, Jones AE, Davitt CM, Schneider CS, Brishois RS, Hiss GA, Wright RW.** Human sperm function in co-culture with human, macaqne or bovine oviduct epithelial cells monolayers. Hum, Reprod 1998; 13: 2797-804.
22. **Pollard 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: 102-7.
23. **Dickens CJ, Southagate J, Lesse JJ.** Use of primary culture of rabbit oviduct epithelial cells to studty of the ionic basis of tubal formation. j Reprod Fertil. 1933; 98: 603-10.
24. **Ouhibi N, Hamidi J, Guillad J, Menezo Y.** Co-culture of one-cell mouse embryo on different cell support. Hum Reprod 1990; 5: 737-43.
25. **Drubin DG, Nelson WJ.** Origins of cell polarity cell, 1996; 84: 335-44.
26. **Fawcett DW.** A textbook of histology: epithelium. Twelfth Edition. 1994; p. 64.
27. **Shaw AJ.** Epithelial cell culture: A practical Approcech: Modelling epithelial tissue in vitro. 1996; pp: 1-15.
28. **Crow J, Amos NA, Lewin J.** Morphology and ultrastructure of fallopian tube epithelium at different stages of the menstural cycle and menopause. Hum Reprod 1994; 9: 2224-33.
29. **Comer MT, Leese HJ, Sonthgate J.** Induction of differentiated ciliated cell phenotype in primary culture of fallopian tube epithelium. Hum Reprod 1998; 13: 3114-20.
30. **Kurita T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'malley BW, Cunha JR.** Stromal progestrone receptors mediate the inhibitory effects of progestrone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. Endocrinology 1998; 139: 4708-13.
31. **Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawant, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahan DB, Cunha JR.** Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. Proc Natl Acad Ci USA 1997; 94: 6535-40.



شکل ۱. فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته روی پلاستیک. سایتوکراتین ۷ در سیتو پلاسم سلولهای پوششی به رنگ قهوه‌ای در آمده است، ایمونوسیتوشیمی، بزرگنمایی ۲۰۰ × (a). کنترل منفی: سلولهای کشت یافته که تمام مراحل رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی به استثنای استفاده از آنتی سایتوکراتین ۷ را طی کرده‌اند، بزرگنمایی ۲۰۰ × (b). کنترل مثبت: بافت اندومتریوم انسانی، بزرگنمایی ۱۰۰ × (c).



شکل ۲. فتومیکروگراف مقطع مخاط لوله رحم انسانی، Bar=۵μm (a). الکترون میکروگراف سلولهای پوششی لوله رحم انسانی Bar=۱/۵μm (b). فتومیکروگراف مقطع سلول کشت شده روی پلاستیک. در گوشهٔ بالا، سمت راست تصویر میکروسکوپ فازکنتراست معکوس این سلولها مشاهده می‌شود، Bar=۵μm (c). الکترون میکروگراف سلولهای کشت یافته روی پلاستیک، Bar=۱۶۰nm (d) و (e) و (f). C : مژک، D : سلول تیره، C : سلول روشن، N : هسته، P : زائده سطح سلول، D : اتصال شبکه دسموزوم، V : واکوئل ،I: فرورفتگی در هسته.



شکل ۳. فتومیکروگراف سلول کشت یافته روی ژل ECM. در بالا و سمت راست، تصویر میکروسکوپ و معکوس این سلولها مشاهده می‌شود، (a) Bar=۵μm. الکترون میکروگراف مقطع سلولهای کشت یافته روی ژل ECM، (b) Bar=۲μm. (c) Bar=۱۶۰nm و (d) Bar=۱۰۰nm و (f) و (e).

N : هسته، M : میکروویلی، S: گرانول ترشحی، E: دستگاه اندوپلاسمی خشن (rER)، M: میتوکندری، LD : قطرات چربی، C : مژک، G : کمپلکس گلژی، F : سلول فیبروبلاستی