بررسی اثرات ماتریکس خارج سلولی مصنوعی برروی عملکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان درمحیط *In vitro*

دکتر معرفت غفاری – عضو شورای علمی پژوهشکده ابن سینا و استادیار و عضو تیم تخصصی مرکز نازائی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

اهمیت ماتریکس خارج سلولی (ECM) در تکامل و کارکرد سلولهای مختلف گزارش شده است ولی اطلاعات کمی در رابطه با نقش آن در کارکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان در دست می باشد. در این تحقیق اثرات ECM مصنوعی (Matrigel) روی عملکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر با استفاده از تکنیکهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش : نمونه های اندومتر با اطلاع بیمار و تأیید کمیته اخلاقی از ۱۷ زن با باروری قبلی بوسیله هیسترکتومی کامل شکمی تهیه شد. بافت به روش آنزیمی و مکانیکی مجزا شده و محلول غنی از سلولهای اپی تلیالی بوسیله سانتریفوژ بدست آمد که بر روی پلاستیک یا داخل Matrigel به منظور تولید سلولهای پولاریزه کشت داده شد و محیط کشت با یا بدون هورمون پروژسترون (10^{-6} M) به سلولها اضافه شد. مقدار RNA و DNA سلولها پس از استخراج با استفاده از اسپکتوفتومتری اندازه گیری شد.

نتایج : مقدار کل RNA در سلولهای کشت داده شده روی Matrigel (۲۳±۱/۵ Pg/cell) بیش از دو برابر سلولهای کشت داده شده روی پلاستیک (۹/۱±۱/۴ Pg/cell) بود. هورمون استروئیدی سبب افزایش RNA در سلولهای کشت داده شده در هر دو مدل شده ولی میزان افزایش در سلولهای کشت داده شده روی ECM بیشتر از پلاستیک بود. سلولهای کشت داده شده روی پلاستیک سریعاً پرولیفره شده تا زمانی که تمام سطح پلاستیک را بپوشاند ولی سلولهای کشت داده شده روی ECM دارای تکثیر محدود بوده و بعد از ۵ روز تکامل پیدا کرده و پولاریزه شد.

نتیجه گیری : این نتایج نشان داد که ECM نقش مهمی در بروز ژن، پولاریزه شدن و تکامل سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان در محیط آزمایشگاه بازی می کند.

واژه های کلیدی : انسان ، اندومتر، EMC , *In Vitro*

آدرس مکاتبه : تهران – اوین – دانشگاه شهید بهشتی – انتهای بلوار – پژوهشکده ابن سینا

صندوق پستی : ۱۷۷– ۱۹۸۳۵

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

اساساً دو نوع ماتریکس خارج سلولی ECM (Extra Cellular Matrix) وجود دارد. نوع interstitial matrix ، غنی از مواد زمینه کلاژن بوده و فیبروبلاستهای استروما در آن قرار گرفته اند و نوع BM (Basement Membrane) که دارای ضخامت ۱۰۰-۲۰ نانومتر بوده و سلولهای اپی تلیال به آن متصل میشوند (۱).BM حاوی کلاژن تیپIV وگلیکوپروتئین های لامینین، انتاکتین وهپارین سولفات میباشد(۲).

BM در تکامل و عملکرد بافتهای مختلف نقش مهمی بازی می کند.مهاجرت سلولها در طول تکاملشان اغلب در مجاورت **BM** انجام شده و وجود آن برای پولاریزاسیون سلولهای اپی تلیال لازم می باشد. BM بعنوان سوبسترا برای اتصال سلولها و مهاجرت آنها در طول ترمیم زخمها و بازسازی اعصاب عمل می کند (۳و ۴و۵).

جداسازی و استخراج اجزای BM و مطالعه اثرات آنها روی سلولها در *in vitro* نشان می دهد که BM نقش بسیار مهمی روی رفتار و عملکرد سلولها بازی میکند(۵). BM بوسیله اینتگرینها، پروتئوگلیکانهاولکتین ها به سلولها متصل شده و فنوتیپ سلولها را در *in vitro* تعدیل می کند (۶).

BM همچنین بعنوان محلی برای ذخیره فاکتورهای رشد محسوب شده و فعالیت آنها را تنظیم می نماید(۷). مطالعات اخیر نشان می دهد که اختلال در اتصال سلولها به ECM در *in vitro* سبب شروع مرگ برنامه ریزی شده (apoptosis) در آنها می شود (۸و۹و۱۰). علیرغم مطالعات فراوان اثرات BM روی سلولهای بافتهای مختلف ، بررسیهای بسیار معدودی روی سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان که نقش مهمی در مراحل اولیه لانه گزینی جنین بازی می کنند انجام گرفته است. در این مطالعه از Matrigel که بسیار شبیه BM بوده و از موشهای با سارکومای Engelbreth-Holm-swarm بدست می آید، استفاده شد و سلولهای اپی تلیالی اندومتر انسان با Matrigel و بدون آن کشت داده شده و با هم مقایسه شد تا اثرات ECM روی عملکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر در محیط آزمایشگاه مطالعه شود.

روشها و مواد

تهیه بافت

بافت اندومتر بوسیله هیسترکتومی کامل شکمی از ۱۷ زن (جدول شماره ۱) با ویژگیهای سنی ۴۸-۳۲ سال، سابقه یک یا بیش از یک حاملگی موفق، سیکل قاعدگی منظم ۲۵ تا ۳۵ روز، عدم مصرف قرص ضد بارداری و یا IUDs حداقل سه ماه قبل از عمل، عدم وجود اشکالات پاتولوژیک از قبیل کارسینومای تخمدان، لوله رحم یا سرویکس دربیمارستان زنان Jessop ، شهرشفیلد انگلستان تهیه شد .

تمام بافتها با اطلاع و رضایت کامل بیماران و کمیته اخلاقی جمع آوری شدند.با استفاده ازیک کورت بیوپسی (Down's Surgical Ltd , Sheffield , Sharman's UK) یک تکه از ناحیه فوندوس و قسمت فوقانی تنه رحم برداشته شد و سپس به دو قسمت تقسیم شد که یک تکه برای پروسه میکروسکوپ نوری و الکترونی به منظور تشخیص طبیعی بودن اندومتر و تعیین مرحله سیکل قاعدگی بکار برده شد.

این نمونه بعنوان OB (Original Biopsiys) نامیده شد و قسمت دیگر برای کشت سلولی استفاده شد.

Downloaded from http://www.jri.ir

OBs	بدون هورمون جنسی		با هورمون جنسی	
روز سیکل قاعدگی	Plastic (N= 17)	ECM (N= 17)	Plastic (N= 6)	ECM (N= 6)
۱	+	+	-	-
۲	+	+	-	-
۵	+	+	-	-
۷	+	+	-	-
۹	+	+	-	-
۱۱	+	+	-	-
۱۳	+	+	-	-
۱۴	+	+	+	+
۱۵	+	+	+	+
۱۶	+	+	+	+
۱۷	+	+	+	+
۱۸	+	+	+	+
۱۹	+	+	+	+
۲۱	+	+	-	-
۲۲	+	+	-	-
۲۳	+	+	-	-
۲۵	+	+	-	-

جدول شماره یک : افراد مورد مطالعه

روز سیکل قاعدگی OBs بوسیله اولین روز آخرین پریود (LMP) و میکروسکوپ نوری و الکترونی مشخص شدند.

+ موارد مورد استفاده برای مطالعه

ـ موارد استفاده نشده برای مطالعه

آماده سازی بافت برای کشت سلولی

بافت اندومتر با یک تیغ اسکالپل تکه تکه شده و به لوله سانتریفوژ حاوی ۵ میلی لیتر کلاژناز (۲۵٪ ,GradeIV) (Sigma, England) در HBSS ۱۰٪ گذاشته و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۲ ساعت قرار داده شد. در این مدت لوله با ورتکس هر ۱۵ دقیقه تکان داده شد. پس از ۲ ساعت که سلولها ته نشین شدند قسمت روئی (حاوی کلاژناز) برداشته و سپس بافت ته نشین شده با ۵ میلی لیتر HBSS ۱۰٪ به صورت سوسپانسیون سلولی درآمد.پس ازآن محلول روئی (حاوی سلولهای غنی از اپی تلیال) برداشته ودرلوله سانتریفوژریخته وبا دور g ۱۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. قسمت روئی دور ریخته و رسوب بوسیله ۵ میلی لیتر محیط Dulbecc's/Hams F12 (Life Technologies Ltd Scotland) حاوی L-glutamine ۱٪ ، Nu serum ۲/۵٪ ، سرم جنین گاو ۲/۵٪ ، استرپتومایسین و پنی سیلین ۱٪ ، بافر HEPES ۲٪ و سدیم بی کربنات ۳٪ به حالت تعلیق درآمد. ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولهای غنی از اپی تلیال روی پلاستیک (روش استاندارد) و یا روی Matrigel به منظور تولید سلولهای پولاریزه کشت داده شد.

کشت پولاریزه سلولهای اندومتر

نوع HA millicell insert با پرزهای (۰/۵μm ,Millipore UK) راداخل پلیت کشت چندخانه ای گذاشته و حدود۰/۱۵ میلی لیتر (Uniscience Collabovative Matrial Biomedical Products, Bedford, USA) داخل millicell ریخته شد. ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون سلولهای اپی تلیال روی Matrigel قرار داده شد و ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت در اطراف millicell ریخته شد تا محیط کشت از طریق سوراخ های قسمت تحتانی millicell به سلولهای اندومتر برسد. سپس پلیت در یک انکوباتور با ۵٪ گاز Co2 و۹۵٪ هوا و درجه حرارت ۳۶/۵ درجه سانتیگراد گذاشته و هر ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض شد. سلولها به مدت ۷ روز کشت داده و سپس زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند.

کشت سلولهای اندومتر روی پلاستیک و ECM با هورمونهای استروئیدی

به منظور بررسی اثرات هورمونهای استروئیدی بر میزان RNA کل تولید شده توسط سلولهای اندومتر در محیط آزمایشگاه، سلولهای اندومتر از مرحله اول لوتئال سیکل قاعدگی بدست آمد و روی پلاستیک و ECM کشت داده شدند و نیم میلی لیتر محیط کشت $DMEM-F_{12}$ که حاوی هورمون پروژسترون (غلظت 10^{-6} M) (Sigma Aldrich, Poole, England) بود به سلولها اضافه شد و هردو روز یکبار محیط کشت با محیط کشت جدید حاوی هورمون جنسی بمدت ۵ روز

Downloaded from http://www.jri.ir

تعویض شد بعد از ۷ روز سلولهای اندومتر جمع آوری و مورد بررسیهای مولکولی قرار گرفتند.

جمع آوری سلولهای کشت داده شده برروی پلاستیک

بعد از ۷ روز که سلولها به ته پلاستیک چسبیدند و حالت confluent پیدا کردند این سلولها بوسیله تریپسین از پلاستیک جداشدند. برای تریپسینه کردن ابتدا محیط کشت برداشته وذخیره شد. سپس۲۰۰ میکرولیترمحلول حاوی تریپسین ۵٪ و EDTA ۲٪ (Gibco, BRL, Paisley Scotland) به هرچاهک اضافه و بوسیله پیپت بطور آهسته چندین بار بالا و پایین کشیده شد. پلیت های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته و هر ۵ دقیقه با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست جهت مشاهده جدا شدن سلولها از ته پلاستیک بررسی گردید. بعد از جدا شدن سلولها (حدود ۲۰ دقیقه) ۰/۵میلی لیتر محیط کشت به چاهک اضافه شد و سوسپانسیون سلولی تشکیل شده را برداشته و در کرایوویال (company, England Nalge) ۲ میلی لیتری گذاشته و با دور g ۱۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول روئی رادور ریخته ورسوب در۰/۵ میلی لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآمد ودر نیتروژن مایع برای مطالعات بعدی ذخیره شد.

جمع آوری سلولهای کشت داده شده بر روی ECM

بعد از ۷ روز که سلولها پولاریزه شدند محیط کشت برداشته و ذخیره شد. فیلتر قسمت تحتانی insert بوسیله یک تیغ استریل بریده شد. ژل که حاوی سلولها بود جدا ودرکرایوویال ۲ میلی لیتری گذاشته شد.۰/۵ میلی لیتر محیط کشت به آن اضافه و داخل نیتروژن مایع برای مطالعات بعدی ذخیره شد.

استخراج RNA و DNA از سلولهای اندومتر

استخراج RNA

سلولهای اندومتر ذخیره شده در نیتروژن مایع بعدازآب شدن،بداخل لوله میکروسانتریفوژ۱/۵ میلی لیتر (Sarstedt, Numbrecht, Germany) منتقل شد. سلولها پس ازچندثانیه سانتریفوژ ته نشین شده و محیط کشت روئی آن برداشته و دور ریخته شد . یک میلی لیتر محلولTrizol (Life Technologies USA) به سلولها اضافه و بمدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Fisons, UK) به نمونه ها اضافه و سپس تکانهای شدید بمدت ۱۵ ثانیه شدیداً تکان داده شد وبعد از آن در درجه حرارت اتاق بمدت ۳ دقیقه نگهداری شد. نمونه ها با دور g ۱۲۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه و در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد سانتریوفوژ ۳۲ شد. قسمت فوقانی و شفاف برداشته و به یک لوله میکروسانتریفوژ ۱/۵ میلی لیتری استریل و تازه انتقال داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Fisons, UK) به نمونه ها اضافه و در درجه حرارت اتاق بمدت ۱۰ دقیقه قرار داده و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد.

محلول روئی حاصل دور ریخته و رسوب ها در یک میلی لیتر اتانل ۷۵٪ (BDH,UK) شسته و در درجه حرارت اطاق خشک شد و با افزودن ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دوبارتقطیربه حالت سوسپانسیون درآمد و در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه قرارداده شد. RNA کل سپس در درجه حرارت ۷۰ – درجه سانتی گراد ذخیره شد. مقدار RNA کل و درجه خلوص آن با اسپکتروفتومتری ارزیابی شد.

استخراج DNA

باقیمانده فاز آبی که روی فاز بینابینی قرار گرفته بود، برداشته و به یک لوله میکروسانتریفوژ ۱/۵ میلی لیتری استریل منتقل شد. سیصد میکرولیتر اتانل ۱۰۰٪ به آن اضافه شد و پس از مخلوط کردن نمونه ها در درجه حرارت اتاق بمدت ۳ دقیقه قرار داده و سپس در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلولهای روئی دور

Downloaded from http://www.jri.ir

ریخته شدورسوبهادوباربامحلول حاوی سیترات سدیم M ۰/۱ در اتانل ۱۰٪ شسته شد. در هر بار شستشو رسوبها در محلول شستشو بمدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اطاق قرار داده شد و سپس بمدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد با دور g ۲۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. بدنبال دو بار شستشو،محلول روئی دور ریخته ورسوبها در ۱/۵ میلی لیتر اتانل ۷۵٪به حالت سوسپانسیون درآمده و در درجه حرارت اطاق بمدت ۲۰ دقیقه گذاشته شد. سپس بمدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد با دور g ۲۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از آن رسوبها بمدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اطاق گذاشته تا خشک شد و سپس در ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم mM ۸ حل شد و مجدداً در درجه حرارت اطاق بمدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول روئی حاوی DNA به یک لوله تازه منتقل و در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد ذخیره شد.

DNA کل بدست آمده به وسیله اسپکتروفتومتری در میزان جذب خطی ۲۶۰nm و فرمول DNA (µg/µl) total=۰/۰۵ × $OD_{۲۶۰}$ ارزیابی شد (۱۱). از آنجائی که میزان DNA درهرسلول دیپلوئیدی درانسان برابر ۷/۱ pg می باشد مقدار DNA به ۷/۱ pg تقسیم شد تا تعداد سلولها در هر نمونه محاسبه شود مقدار Total RNA برای هر سلول با تقسیم میزان کل RNA به تعداد کل سلولها بدست آمد.

نتایج

اثرات ECM روی عملکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر

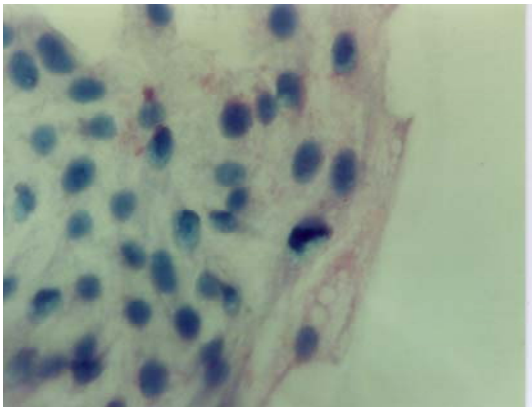
به منظور مطالعه اثرات ECM روی عملکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان در محیط آزمایشگاه سلولهای اپی تلیال اندومتر از سرتاسر روزهای سیکل قاعدگی تهیه و بر روی ECM (روش پولاریزه) و پلاستیک (روش استاندارد) بمدت ۷ روز کشت داده شدند. یافته های این مطالعه نشان داد اگرچه تعداد سلولهای استفاده شده در هر دو مدل (استاندارد و پولاریزه) یکسان بودند ولی بعد از ۷ روز کشت، تعداد سلولهای بدست آمده با استفاده از تریپسین از روش کشت استاندارد چندین برابر بیشتر از روش کشت پولاریزه بود که نشانه میتوز و پرولیفراسیون فراوان در کشت روی پلاستیک میباشد. در حقیقت سلولهای اپی تلیالی کشت داده شده بر روی پلاستیک تا زمانی که تمام سطح پلاستیک را اشغال نکنند و حالت confluent ایجاد نکنند به پرولیفراسیون و تکثیر خود ادامه میدهند. در صورتیکه سلولهای اپی تلیال کشت داده شده بر روی ECM دارای میتوز محدود بوده و بعد از چند روز تشکیل غددی مشابه آنچه در *in vivo* دیده میشود را میدهند (شکل ۱و۲). همچنین سلولهای اپی تلیال در کشت استاندارد از نظر ساختمانی بصورت پهن و سنگفرشی بوده در صورتیکه در کشت پولاریزه سلولها بصورت قطبی بوده و مشابه مورفولوژی سلولها در *in vivo* هستند. با اندازه گیری میزان Total RNA در هر سلول مشاهده شد که مقدار Total RNA در سلولهای کشت داده شده روی ECM در هر سلول (pg ۱/۵± ۲۳) بود که تقریباً ۲/۵ برابر مقدار RNA در سلولهای روی پلاستیک (در هرسلول pg ۱/۴± ۹/۱) بود.

اثرات هورمون پروژسترون روی سلولهای اپی تلیال اندومتر

به منظور بررسی پاسخ سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان به هورمون پروژسترون در محیط آزمایشگاه، سلولهای اپی تلیال اندومتر از مرحله اولیه لوتئال سیکل قاعدگی تهیه و به دو روش استاندارد و پولاریزه با افزودن هورمون پروژسترون کشت داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که پروژسترون در هر دو مدل سبب افزایش تولیدRNA کل درسلولهاشده که این میزان درسلولهای کشت داده شده روی ECM (در هر سلول

Downloaded from http://www.jri.ir

pg ۲± ۳۰) بطـور معنـی داری بیشـتر از کشـت روی پلاستیک (در هر سلول pg ۱/۹± ۱۲) بود.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ نوری سلولهای اندومتر کشت داده شده برروی پلاستیک

شکل ۲ – تصویر میکروسکوپ نوری سلولهای اندومتر کشت داده شده برروی ECM

بحث

ایـن مطالعـه نشـان داد که ECM بطور اساسی روی عملکـرد و تکامل سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان تأثیر مـیگذارد. ECM بطور معنی داری باعث افزایش بروز ژن در سلولهای اپی تلیال اندومتر میشود که این اثر بر روی سایر سلولهای اپی تلیال نیز گزارش شده است.

Caron و همکـاران (۱۲) نشـان دادنـد که ECM باعث افـزایش بـروز ژن در سـلولهای کـبدی میشـود. Lee و همکـاران (۱۳) گزارش نمودند سلولهای اپی تلیال پستان مـوش کـه بـر روی ECM کشـت داده شـده بودنـد در مقایسـه بـا سـلولهایی که روی پلاستیک کشت داده شده بودنـد ۳ تـا ۱۰ برابـر بیشتر mRNA اختصاصی Casein تولید میکنند. همچنین این سلولها که بر روی ECM کشت داده شده بودند مقدار بسیار زیادی Transferrin mRNA (۱۴) و Muc-1 mucin mRNA (۱۵) در مقایسـه بـا سلولهایی که روی پلاستیک بودند تولید میکند.

Streuli و همکـاران (۱۶) لازمـه فعـال شـدن نسـخه برداری ژنهای تولید کننده شیر را در سلولهای اپی تلیال پسـتان مـوش اثـرات مـتقابل بیـن سـلولهای اپی تلیال با laminin غشـاء پایـه (BM) از طـریق گـیرنده سـطحی Integrin در سـطح سـلول گـزارش نمودنـد. آنهـا (۱۷) با بکـار بـردن آنتـی بـادی Anti-Integrin کـه بلـوک کـنده عملکـرد Integrin میباشد نشان دادند که توانایی تولید بتا casin توسـط سـلولهای اپـی تلـیال پستان موش به طور شدیدی کاهش می یابد.

ایـن مطالعه نشان داد که ECM در اثر واکنش متقابل بـا سـلولهای اپـی تلـیال بـا جلوگـیری از میـتوز و پرولیفراسـیون سلولها منجر به تکامل سلول و ارگانهای داخـل سـلول میشـود. همچنیـن در اثـر اتصـال ECM به مولکولهـای چسـبنده واقـع در سـطح سلول، سیگنالهایی بداخـل سـلول منـتقل که منجر به بازسازی اسکلت داخل سـلول و سیسـتم انـتقال مـواد و ارگانلهـا شـده و باعث پولاریـزه شـدن سـلول میشود (۱۹و۱۸). پولاریزه شدن سلولهای اپی تلیالی اندومتر نقش اساسی در عملکرد آنها در زمـان لانـه گزینـی جنیـن بـازی میکـند. در سـلول پولاریـزه پروتئیـن ها و مولکولهای تولید شده در سلول در اثـر برنامه خاصی به سطوح مختلف سلول منتقل و یا از آن سـطوح ترشـح مـی شـود. بـرای مـثال سـلولهای اپـی تلـیال اندومتر در زمان لانه گزینی تولید مولکولهای چسـبنده خاصـی بنام مولکولهای چسبنده Integrin کرده کـه بـه سطح آپیکال سلول منتقل میشود (۲۱و۲۰). ظهور

Downloaded from http://www.jri.ir

این مولکولهای چسبنده با ظهور لیگاندآنها در سطح جنین همزمان بوده که منجر به چسبیدن جنین به اندومتر میگردد و یا سلولهای اپی تلیال اندومتر در زمان لانه گزینی تولید فاکتورهای داخلی (سایتوکاین و فاکتور رشد) کرده که از قسمت فوقانی سلول ترشح و سبب تکامل جنین میشود (۲۲). پولاریزه شدن سلول همچنین سبب میشودکه در زمان لانه گزینی سلول اپی تلیال اندومتر تولید فاکتورهای داخلی خاصی کرده که از سطح تحتانی سلول ترشح و سبب decidualization استرومای اندومتر میشود (۲۳).

نتایج این مطالعه نشان داد که سلولهای اپی تلیالی اندومتر در محیط آزمایشگاهی صرفنظر از نوع کشت با افزایش بروز ژن در سلول به هورمون پروژسترون پاسخ میدهد. مطالعات دیگری نیز وجود دارد که تأیید کننده این موضوع می باشد(۲۴). همچنین ما (۲۵) در مطالعه دیگری با استفاده از تکنیک مورفومتری و میکروسکوپ الکترونی نشان دادیم که پروژسترون در محیط آزمایشگاهی باعث افزایش نسبت یوکروماتین به هتروکروماتین در هسته سلول اپی تلیال اندومتر میشود که نشانه فعال شدن سلول در جهت افزایش بروز ژن بوده و تأیید کننده افزایش میزان RNA کل سلول میباشد. این نتایج در مجموع بیانگر وجود گیرنده های پروژسترون (PR) دراین سلولهادرمحیط کشت میباشد.

میزان PR در سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان در *in vivo* تحت تأثیر هورمون استروژن در مرحله پرولیفراتیو سیکل قاعدگی سیر صعودی پیدا کرده و به حداکثر خود در اوایل فاز لوتئال میرسد. بعد از تخمک گذاری که با افزایش هورمون پروژسترون همراه میباشد میزان PR در این سلولها در اثر هورمون پروژسترون سیر نزولی پیدا کرده و به حداقل خود در انتهای فازلوتئال میرسد (۲۶).

به همین دلیل در این مطالعه ، نمونه ها از مرحله اولیه فازلوتئال که بیشترین میزان PR را داشته استفاده شده تا اثر هورمون پروژسترون بر روی سلولهای اپی تلیال بهتر بررسی شود.

یافته های این مطالعه نشان داد که سلولهای کشت داده شده روی پلاستیک (که تولید سلولهای غیر پولاریزه میکند) نسبت به سلولهای کشت داده شده روی ECM (که تولید سلولهای پولاریزه میکند) به مراتب کمتر به هورمون پروژسترون پاسخ میدهند که نشان دهنده تعداد کمتر گیرنده های پروژسترون در سلولهای غیرپولاریزه میباشد.علت این تفاوت در تعداد گیرنده های پروژسترون میتواندناشی ازاختلال درتولیداین گیرنده ها در سلولهای غیرپولاریزه باشد. لازمه تولید گیرنده های پروژسترونی که از نوع پروتئین می باشد سلامت در فرآیند پروتئین سازی (نسخه برداری، ترجمه و مرحله بعد از ترجمه) می باشد.

Lee و همکارانش (۱۲) نشان دادند که سلولهای اپی تلیال پستان موش کشت داده شده روی پلاستیک در مرحله بعد از ترجمه به علت اشکال در سیستم اسکلت سلولی دچار نقص میباشد. لذا تعداد کمتر گیرنده های پروژسترون در سلولهای غیر پولاریزه میتواند بدلیل اختلال در مرحله بعد از ترجمه و تولید کمتر گیرنده پروژسترون باشد.

مطالعات نشان میدهد که گیرنده های پروژسترون داخل سلولی بعد از تولید ، بطور فعال و با صرف انرژی بداخل هسته منتقل (Nucleocytoplamic shuttling) تا پس ازاتصال با پروژسترون در داخل هسته باعث افزایش نسخه برداری از ژنهای خاصی شود(۲۷).

با توجه به اینکه ارگانلهای داخل سلول از جمله میتوکندری که تولید کننده انرژی سلولی می باشد ، در سلول غیر پولاریزه تکامل نیافته و به تعداد کمتر وجود دارد لذا کاهش تولید انرژی در این سلولها و یا اختلال در سیستم اسکلتی داخل سلول که در بالا بیان شد

Downloaded from http://www.jri.ir

میتواند سبب کاهش انتقال گیرنده پروژسترون به داخل هسته سلول غیرپولاریزه شده و توجیه کننده پاسخ ضعیف تر سلولهای غیرپولاریزه به پروژسترون در مقایسه با سلولهای پولاریزه باشد.

نتیجه گیری

ECM نقش اساسی در تکامل و عملکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر انسان بازی می کند و مطالعه عملکرد سلولهای اپی تلیال اندومتر در میحط آزمایشگاه بدون استفاده از ECM نمی تواند نشانگر عملکرد واقعی آن در داخل بدن باشد.

Downloaded from http://www.jri.ir

References

1. Junqueira, L. C., Carneiro, J. and Kelly, R. O. Basic Histology. 7th ed. Applenton and Lange, Norwalk, Connecticut. 1992: 66-71.
2. Aplin, J. D., Charlton, A. K. and Ayad, S. An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. Cell Tissue Res. 1988; 253 (1): 231-40.
3. Streuli, C. H. and Bissell, M. J. Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. Journal of Cell Biology.1990; 110 (4): 1405-1416.
4. Paulsson, M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1992; 27 (1-2): 93-127.
5. Kleinman, H. K., Luckenbill Edds, L., Cannon, F. W. and Sephel, G. C. Use of extracellular matrix components for cell culture. Anal Biochem. 1987; 166 (1): 1-13.
6. Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 1992; 69 (1): 11-25.
7. Klagsbrun, M. The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulfate interactions in cells and extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol. 1990; 2 (5): 857-63.
8. Frisch, S. M. and Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. Journal of Cell Biology. 1994;124 (4): 619-626.
9. Ruoslahti, E. and Reed, J. C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. Cell. 1994; 77(4): 477-8.
10. Pullan, S., Wilson, J., Metcalfe, A., Edwards, G. M., Goberdhan, N., Tilly, J., Hickman, J. A., Dive, C. and Streuli, C. H. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. Journal of Cell Science. 1996; 109 (3): 631-642.
11. Freifelder,D.Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology. W. H. Freeman and Company, CA. 1982: 494-536.
12. Caron, J. M. Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. Mol Cell Biol. 1990; 10 (3): 1239-43.
13. Lee, E. Y. H. P., Lee, W. H., Kaetzel, C. S., Parry, G. and Bissell, M. J. Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: Regulation of casein gene expression and secretion. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America. 1985; 82 (5): 1419-1423.
14. Chen, L. H. and Bissell, M. J. Transferrin messenger RNA level in the mouse mammary gland is regulated by pregnancy and extracellular matrix. Journal of Biological Chemistry. 1987; 262 (36): 17247-17250.
15. Parry, G., Li, J., Stubbs, J., Bissell, M. J., Schmidhauser, C., Spicer, A. P. and Gendler, S. J. Studies of Muc-1 mucin expression and polarity in the mouse mammary gland demonstrate developmental regulation of Muc-1 glycosylation and establish the hormonal basis for mRNA expression. Journal of Cell Science. 1992; 101(1): 191-199.
16. Streuli, C. H. and Bissell, M. J. Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. Journal of Cell Biology. 1990; 110 (4): 1405-1416.
17. Streuli, C. H., Bailey, N. and Bissell, M. J. Control of mammary epithelial differentiation: Basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. Journal of Cell 1991.
18. Sugrue, S. P. and Hay, E. D. Response of basal epithelial cell surface and Cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules. Journal Cell Biol. 1981; 91(1):45-54. Biology. 115 (5): 1383-1396.
19. Tomasek, J. J., Hay, E. D. and Fujiwara, K. Collagen modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroma fibroblasts: distribution of actin, alpha-actinin, and myosin. Dev Biol. 1982; 92 (1): 107-22.
20. Lessey, B. A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S. M. and Buck, C. A. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. Journal Clin Invest. 1992; 90 (1): 188-95.
21. Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Sawin, S. W. and Sun, J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. Fertil Steril. 1995; 63 (3): 535-42.
22. Tabibzadeh, S. and Babaknia, A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. Human Reproduction. 1995; 10 (6): 1579-1602.
23. Tang, B., Guller, S. and Gurpide, E. Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization. 1994; Ann N Y Acad Sci. 734: 19-25.
24. Giudice, L. C. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: Their

Downloaded from http://www.jri.ir

potential relevance to reproductive medicine. Fertility and Sterility. 1994; 61 (1): 1-17.
25. Ghaffari M., Warren MA, Cooke ID. Some effects of leukaemia inhibitory factor supplementation on human polarised endometrial epithelial cells in vitro. Journal of Reproduction and Fertility. 1997; 20:13.
26. Ingamells, S., Campbell, I. G., Anthony, F. W. and Thomas, E. J. Endometrial progesterone receptor expression during the human menstrual cycle. Journal of Reproduction and Fertility. 1996; 106 (1): 33-38.
27. Speroff, L., Glass R.H., Kase, N.G.: Clinical Gynecologic Endocrinology and infertility (six edition), Londen, williams & wilkins, 1999: 53-70.

Downloaded from http://www.jri.ir