

The Effect of a Co-culture of Mouse Fallopian Tube Cells on Proliferation of Human Endometrial Stem Cells

Shokrieh Ehsani¹, Mojdeh Salehnia^{2*}, Nasim Ghorbanmehr³

1- M.Sc., Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: salehnm@modares.ac.ir

Received: 28/May/2014, Accepted: 21/Jan/2015

Abstract

Objective: This study evaluates the effect of a mouse fallopian tube cell co-culture on the proliferation of human endometrial stromal cells.

Methods: We used hysteroscopy to collect the endometrial cells from the uterus. The cells were isolated with collagenase type 3 and passed through 150 μm and 40 μm filters, respectively, after which the isolated cells were cultured in DMEM/F12 medium. At the end of the fourth subculture we used flow cytometry to evaluate the percentage of CD90 positive cells. The endometrial cells were co-cultured with mitomycin C-treated cells from the mouse fallopian tube as the experimental group. Those cultured without the feeder layer were considered the control group. The proliferation rate of cells in both groups were compared by the MTT assay

Results: The endometrial cells adhered to the floor of the plate after 24 hours. After 72 hours, they had a spindle shape which was similar to fibroblasts. The rate of CD90 positive cells at the fourth passage was $94.26 \pm 0.08\%$. The proliferation rate of the co-culture experimental group was 1.1 ± 0.02 and for the control group, it was 1.17 ± 0.17 which was not significantly different.

Conclusion: Co-culture of mouse fallopian tube cells with endometrial stem cells did not affect the proliferation rate of endometrial stem cells.

Keywords: Human endometrial stem cell, Co-culture, Mouse fallopian tube

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 2, Pages: 1-11

تأثیر سیستم هم‌کشتی سلول‌های لوله فالوپ موش بر تکثیر سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی

شکریه احسانی^۱، مژده صالح نیا^{۲*}، نسیم قربانمهر^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: salehnim@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۰۱

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۰۷

چکیده

هدف: بررسی تأثیر سیستم هم‌کشتی سلول‌های لوله فالوپ موش بر تکثیر سلول‌های بنیادی استرومای آندومتر انسانی
مواد و روش‌ها: سلول‌های آندومتر از نمونه‌های هیستریکتومی استخراج شد. سپس سلول‌ها با استفاده از روش هضم آنزیمی و کلاژناز تیپ ۳ جداسازی شدند و پس از آن سلول‌ها به ترتیب از فیلترهایی به ابعاد ۱۵۰ و ۴۵ میکرومتر عبور داده شدند و در محیط کشت DMEM+F12 کشت شدند. در پایان پاساژ چهارم برای تأیید ماهیت مزانشیمی سلول‌ها، از نشانگر CD90 استفاده شد و سلول‌های CD90 مثبت با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی شدند. سپس سلول‌های حاصل از کشت مرحله چهارم در دو گروه استفاده شد. در یک گروه، پس از کشت سلول‌های لوله فالوپ موش و تهیه تک لایه از آن‌ها، سلول‌ها با میتوماکسین C غیر فعال شد و به‌عنوان لایه پشتیبان استفاده شد و در گروه دیگر به تنهایی کشت شد. نرخ تکثیر در هر دو گروه (سلول‌های بنیادی آندومتر بدون هم‌کشتی با لوله فالوپ و با هم‌کشتی) با استفاده از آزمون MTT بررسی و سپس مقایسه شد.

نتایج: سلول‌های آندومتر انسانی ۲۴ ساعت پس از کشت به کف فلاسک چسبیدند و با گذشت ۷۲ ساعت این سلول‌ها دوکی شکل شدند و از نظر مورفولوژی شبیه به سلول‌های فیروبلاست شدند. میزان سلول‌های CD90 مثبت در انتهای پاساژ چهارم $94/26 \pm 0/08$ درصد بود. نرخ تکثیر در سلول‌های بنیادی استرومای آندومتر تحت هم‌کشتی و سلول‌های بنیادی بدون هم‌کشتی با لوله فالوپ به ترتیب $1/1 \pm 0/02$ و $1/17 \pm 0/17$ بود و بین این دو گروه تفاوت معنی‌دار دیده نشد.
نتیجه‌گیری: هم‌کشتی با سلول‌های لوله فالوپ موش تأثیری بر افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی استرومای آندومتر ندارد.

کلیدواژگان: سلول‌های لوله فالوپ موش، هم‌کشتی، سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، صفحات: ۱-۱۱

مقدمه

تکثیر، توانایی خودبازسازی بالا و توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی است. وجود این سلول‌ها در بافت‌ها عاملی برای بازسازی بافت نیز به شمار می‌آید [۱]

سلول‌های بنیادی بالغین سلول‌های نادری هستند که در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌های بدن وجود دارند و براساس خصوصیات عملکردی‌شان شناخته می‌شوند که شامل قابلیت

هم‌کشتی و سلول‌های بنیادی آندومتر

مهندسی بافت استفاده کرد [۷].

همچنین سلول‌های بنیادی آندومتر با داشتن خصوصیات تمایز به سلول‌های چربی، غضروف، استخوان، ماهیچه، سلول‌های شبه بتای پانکراس و کبدی و عصب در محیط کشت، می‌توانند منبع مناسبی از سلول‌های بنیادی بالغین برای درمان بیماری‌هایی مثل بیماری‌های قلبی، ترمیم غضروف و آسیب‌های طناب نخاعی باشد [۱۰-۱۲].

ولف (Wolff) و همکارانش در سال ۲۰۱۱ تزریق سلول‌های بنیادی آندومتر انسان به مدل پارکینسون (Parkinson) موشی را انجام دادند و تولید دوپامین (Dopamine) توسط این سلول‌ها را نشان دادند. بنابراین این سلول‌ها می‌توانند یک منبع خوب سلولی برای درمان بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی مختلف مثل پارکینسون باشند [۱۰].

با در نظر گرفتن تعداد کم سلول‌های بنیادی بالغین و اهمیت کاربردی آن‌ها، در سال‌های اخیر سعی شده با روش‌های مختلف [۱۳-۱۵] تعداد سلول‌های بنیادی را در شرایط غیر تمایزی افزایش دهند. به این منظور اغلب سعی می‌شود با حضور عامل مهار کننده تمایزی مثل عامل مهار کننده لوسمی (Leukemia Inhibitory Factor: LIF) همزمان هم تکثیر سلول‌های بنیادی را داشته باشند و هم آن‌ها را در شرایط غیر تمایزی نگه دارند. یکی دیگر از روش‌های قابل رقابت در این زمینه استفاده از سیستم هم‌کشتی است.

هم‌کشتی یا Co-culture یکی از روش‌های کشت است که در آن از یک لایه سلولی پشتیبان استفاده می‌شود سیستم هم‌کشتی مزایایی دارند؛ از جمله می‌توان ترشح عوامل محرک رشد، فراهم کردن مواد مغذی، سوبستراهای گوناگون، سایتوکین‌ها، حذف مواد سمی از محیط کشت توسط سلول‌های موجود در لایه پشتیبان را نام برد. بر همین اساس انواع گوناگونی از سلول‌های سوماتیک، نظیر سلول‌های گرانولوزا (Granulosa cells) [۱۵]، سلول‌های لوله فالوپ (Fallopian tube cells)، سلول‌های رحمی انسانی (Human uterine cells) [۱۶]، سلول‌های Vero یا اپیتلیال

سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های سوماتیک چند پتانسیله هستند که در محیط خارج از بدن (In vitro) قادر به تمایز به انواع مختلف سلول هم با منشأ مزودرمی و هم غیر مزودرمی‌اند [۱]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های مختلف بالغین مثل مغز استخوان، عضلات اسکلتی، بافت چربی، خون محیطی، بافت همبند درم و خون بند ناف جدا می‌شوند [۲].

ذخیره‌ای از سلول‌های بنیادی در هر بافتی وجود دارد که می‌تواند در روند رشد، بازسازی، یا ترمیم بافتی شرکت کنند که در واقع همان سلول‌های بنیادی بالغین را تشکیل می‌دهند. یکی از انواع سلول‌های بنیادی بالغین سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی است [۳].

در سال ۲۰۰۷ گارگت (Garget) و همکارانش وجود سلول‌هایی با خصوصیت سلول‌های بنیادی را در بافت آندومتر گزارش کردند. این محققان معتقدند که تغییرات رحم در پاسخ به تغییرات هورمونی مربوط به وجود سلول‌های بنیادی بالغینی است که در بخش‌های آندومتر و میومتر وجود دارد؛ این سلول‌ها کمک می‌کنند تا رحم به وضعیت قبل از تخریب خودش برسد [۴]. سلول‌های بنیادی آندومتر هم در لایه قاعده‌ای و هم عملکردی و به‌خصوص اطراف عروق یافت می‌شوند و همچنین در آندومتر تحلیل رفته زنان پس از سن یائسگی نیز دیده شده است [۵، ۶].

این فرضیه مطرح می‌شود که آندومتر انسانی شامل جمعیت کوچکی از سلول‌های بنیادی اپیتلیالی و استرومایی است که این سلول‌ها خصوصیت خودبازسازی و تمایز را دارا هستند [۷].

با توجه به خصوصیات مشترک بین سلول‌های استرومایی آندومتر و سلول‌های مزانشیمی [۸]، کاربردهایی که برای سلول‌های مزانشیمی وجود دارد در مورد سلول‌های بنیادی آندومتر نیز می‌تواند صادق باشد. از جمله کاربردهای این سلول‌ها استفاده در مهندسی بافت است [۹]. وانگ (Wang) و همکاران در سال ۲۰۱۳ از سلول‌های بنیادی استرومایی آندومتر که دارای خصوصیت شبیه سلول‌های مزانشیمی بودند در

کلیه میمون [۱۷] در سیستم هم‌کشتی های مختلف استفاده شده است [۱۸].

سلول‌های لوله فالوپ موش مجموعه‌ای از سلول‌های اپیتلیالی و سلول‌های فیبروبلاستی است و هر دو نوع سلول قادر به ساخت عوامل رشدی نظیر LIF هستند [۱۸]. هر یک از این ترکیبات رشدی می‌تواند در بهبود روند رشد سلول‌های بنیادی اهمیت داشته باشد اما تاکنون سابقه‌ای در خصوص استفاده از سیستم هم‌کشتی به خصوص سلول‌های لوله فالوپ در تکثیر سلول‌های بنیادی آندومتر وجود ندارد. همچنین در دسترس بودن تعداد مناسب سلول‌های بنیادی بالغین در شرایط غیر تمایزی برای سلول درمانی از اهمیت خاصی در بالین برخوردار است. بنابراین تحقیق حاضر می‌تواند پاسخ مناسبی به این سؤال بدهد که آیا سیستم هم‌کشتی لوله فالوپ موش با سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی می‌تواند باعث افزایش تعداد سلول‌های بنیادی آندومتر بشود یا نه؟

جداسازی و کشت سلول‌های آندومتر

برای جداسازی سلول‌ها ابتدا بافت آندومتر پس از شستشو با بافر فسفات سالین ریز ریز شد و با استفاده از روش هضم آنزیمی با ۳۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر کلاژناز نوع ۳ و ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر DNAase (Sigma) آلمان سلول‌ها جداسازی شدند و پس از آن به ترتیب از فیلترهایی به ابعاد ۱۵۰ و ۴۵ میکرومتر (BD Biosciences، آلمان) عبور داده شد تا سلول‌های اضافی مثل سلول‌های آندوتلیالی و اپیتلیالی حذف شوند [۱۹، ۲۰]. پس از آن شمارش سلولی با لام نئوبار انجام شد و تعداد 8×10^6 سلول در داخل پلیت‌های به قطر ۳ سانتی‌متر ریخته شد و در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد به مدت ۶-۷ روز کشت شدند. پس از پوشیده شدن ۸۰ درصد از کف ظرف به وسیله سلول‌ها از آن‌ها کشت بعدی گرفته شد و تا چهار مرحله پاساژ داده شد.

فلوسایتومتری

سلول‌های کشت شده آندومتر انسان در پاساژ چهارم به تعداد 1×10^6 سلول در میلی‌لیتر به منظور تعیین درصد سلول‌های بنیادی استرومایی CD90 مثبت با به‌کارگیری نشانگر سطح سلولی CD90 به روش فلوسیتومتری ارزیابی شد. ابتدا محیط کشت جمع‌آوری شد و سلول‌ها با بافر فسفات سالین شسته و سپس با تریپسین-EDTA (Sigma) آلمان انکوبه شدند و سوسپانسیون سلولی ساتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات روی رسوب سلولی اضافه شد و با پیپتاژ سوسپانسیون سلولی تهیه شد. ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی کونژوگه CD90 (۱ میکروگرم/ میلی‌لیتر) (Sigma) آلمان اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای یخچال انکوبه شد. برای نمونه کنترل منفی از ایزوتیپ IgG استفاده شد.

تهیه موش ماده

برای تهیه لایه پشتیبان از موش سوری ماده (نژاد NMRI)

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری بافت آندومتر انسان

در این تحقیق بافت آندومتر از زنان بستری در بیمارستان امام خمینی تهران که دچار بیماری مرتبط با آندومتر نبودند و با کسب رضایت نامه از آن‌ها و تکمیل فرم تهیه شد. این بخش از تحقیق طبق موازین مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. این بیماران در محدوده سنی ۲۰-۴۴ ساله بوده و ۳ ماه قبل از جراحی هورمونی دریافت نکرده بودند و چرخه قاعدگی منظمی داشتند و طبیعی بودن نمونه‌های بافتی آن‌ها به تأیید متخصص پاتولوژی رسید. نمونه‌های به‌دست آمده در محیط DMEM+F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12) (Invitrogen انگلستان) که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Invitrogen انگلستان) بود، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد.

هم‌کشتی و سلول‌های بنیادی آندومتر

سلول‌های لوله فالوپ، ابتدا محیط کشت لایه پشتیبان با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر میتومايسين C (Mitomycin C) (Sigma آلمان) تعویض شدند و به مدت ۲-۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محیط حاوی میتومايسين خالی و ۲-۳ مرتبه با فسفات بافر سالین استریل فاقد یون کلسیم و منیزیم شستشو شدند. در مرحله آخر روی سلول‌ها محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو اضافه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس سلول‌های آندومتر انسانی به تعداد 4×10^4 سلول تحت هم‌کشتی با سلول‌های غیر فعال شده با میتومايسين C قرار گرفتند و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند.

MTT assay

آزمون MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) برای سه گروه سلولی انجام پذیرفت: اول برای سلول‌های آندومتر هم‌کشتی شده با سلول‌های لوله فالوپ، دوم برای سلول‌های آندومتر به تنهایی به عنوان گروه شاهد و سوم برای سلول‌های لوله فالوپ که تحت تیمار با میتومايسين C قرار گرفته بودند.

قدرت تکثیر سلول‌های آندومتر در گروه آزمون و کنترل در دو زمان، ۲۴ ساعت (زمان چسبیدن سلول‌ها به ظرف کشت) و ۷۲ ساعت بعد با روش MTT بررسی شد. نسبت ضریب جذب نوری سلول‌ها در دو زمان ذکر شده میزان تکثیر این سلول‌ها را نشان داد. همچنین میزان تکثیر سلول‌های لوله فالوپ غیرفعال شده با میتومايسين C نیز ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از کشت با روش MTT ارزیابی شد. این ارزیابی برای تأیید غیرفعال شدن سلول‌های لوله فالوپ موش انجام شد.

ابتدا در هر گروه تعداد 4×10^4 سلول با بافر فسفات شستشو شدند و ۱۰۰ لاندا محلول MTT در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵

بالغ استفاده شد. این موش‌ها در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب نگهداری شدند. تمام روش‌های مورد استفاده در این مطالعه، طبق موازین مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

جداسازی سلول‌های لوله فالوپ موش

موش‌های بالغ ۶-۸ هفته با روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و لوله‌های فالوپ آن‌ها به وسیله پنس و قیچی استریل جدا شد و در ظرف استریل حاوی بافر فسفات سالین قرار داده شد و به زیر هود منتقل شد. چندین بار با بافر فسفات شستشو داده شد و بافت‌ها تا حد امکان با استفاده از اسکالپل و قیچی خرد شدند. سپس ۳۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر کلاژناز نوع سه به ظرف محتوی بافت‌های خرد شده اضافه شد و به انکوباتور به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شد. پس از آن سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تعداد 4×10^4 سلول در میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو در پلیت‌های مخصوص کشت سلولی ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد کشت شدند.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌های زنده بافت لوله فالوپ موش به کف پلیت چسبیده و سلول‌های خونی به صورت شناور در محیط کشت مشاهده شدند که با تعویض محیط کشت این سلول‌ها از محیط خارج شدند. سلول‌های چسبیده به کف پلیت به مدت ۵ تا ۷ روز دیگر در انکوباتور نگهداری و در این مدت یک روز در میان محیط کشت آن‌ها تعویض شد در طول این مدت سلول‌ها کاملاً کف پلیت را پر کردند و برای هم‌کشتی آماده بودند.

غیر فعال کردن لایه پشتیبان به وسیله میتومايسين C

برای غیرفعال کردن و متوقف کردن تقسیم میتوزی

درصد CO_2 انکوبه شدند. در انتها محلول MTT تخلیه شد و ۱۰۰ لاندا دی متیل سولفاکساید (Dimethyl sulfoxide: DMSO) اضافه شد سپس با دستگاه الیزا در ۵۷۰ نانومتر ضریب جذب نوری خوانده شد.

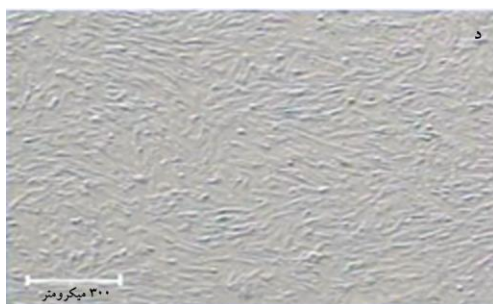
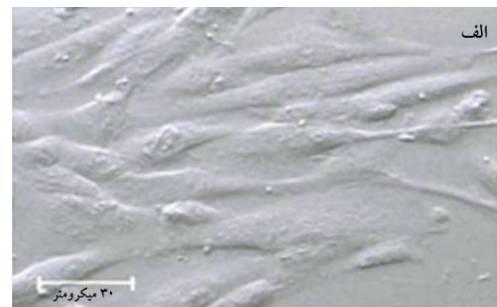
تجزیه و تحلیل آماری

کلیه داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، به کمک آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way analysis of variance: ANOVA) و T-test و آزمون تکمیلی توکی (Tukey)، تجزیه و تحلیل شدند. تمام داده‌ها حداقل ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. سطح معنی‌داری در مقایسه بین گروه‌ها $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

مشاهدات کشت سلول‌های آندومتر انسان

سلول‌های آندومتر انسانی ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه به کف فلاسک چسبیدند. تصویر میکروسکوپ معکوس سلول‌های آندومتر انسان ۲۴ ساعت پس از هضم آنزیمی در شکل ۱ نشان داده شده است. با گذشت ۷۲ ساعت این سلول‌ها دوکی شکل شده و از نظر خصوصیات ظاهری شبیه به سلول‌های فیبروبلاست شدند. این سلول‌ها با سرعت تقسیم شدند. اولین پاساژ سلول‌ها بعد از حدود ۵ روز که ۸۰ درصد از کف فلاسک را پر کرده انجام شد. تصویر میکروسکوپ سلول‌های آندومتر انسان به ترتیب در انتهای پاساژ اول تا چهارم در شکل ۱ (الف تا د) نشان داده شده است.



شکل ۱ فاز کنتراست سلول‌های آندومتر انسان ۲۴ ساعت پس از هضم آنزیمی (الف) در پایان مرحله اول کشت (ب) در پایان مرحله دوم کشت (ج) در پایان مرحله چهارم کشت (د)

نشانهگر CD90 از روش فلوسیتومتری استفاده شد. نتایج در سه بار تکرار نشان داد که درصد سلول‌های CD90 مثبت

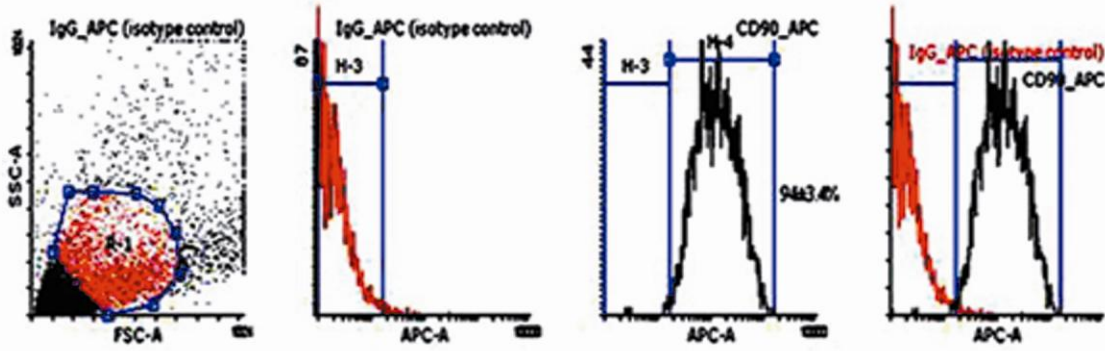
نتایج فلوسیتومتری

در پایان پاساژ چهارم سلول‌های آندومتر جهت بررسی

هم‌کشتی و سلول‌های بنیادی آندومتر

شکل ۲ آورده شده است.

۹۴/۲۶±۰/۰۸ درصد بود. تصاویر به‌دست آمده از دستگاه در



شکل ۲ تصاویر حاصل از فلوسیتومتری نشانگر CD90 سلول‌های آندومتر انسانی در انتهای پاساژ چهارم



شکل ۳ سلول‌های لوله فالوپ موش کشت شده بعد از پاساژ اول (الف) سلول‌های لوله فالوپ ۷۲ ساعت بعد از هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی (ب)

متوقف شده و با سلول‌های آندومتر هم‌کشتی شدند را بعد از ۷۲ ساعت نشان می‌دهد.

نتایج کشت سلول‌های لوله فالوپ موش به‌منظور تهیه تک لایه سلولی

سلول‌های لوله فالوپ موش، بعد از ۴۸ ساعت کشت، توسط میکروسکوب معکوس مشاهده شد که سلول‌ها به کف ظرف چسبیده بودند و ظاهر برخی از سلول‌ها دوکی شکل بودند. تصویر مربوط به کشت سلول‌های لوله فالوپ موش بعد از پاساژ اول در شکل ۳ نشان داده شده است تصویر ۳ سلول‌های لوله فالوپ که با استفاده از میتوماپسین C رشد آن‌ها

نتایج میزان تکثیر سلول‌ها به روش MTT Assay

میانگین میزان ضریب جذب نوری حاصل از آزمون MTT assay سلول‌های آندومتر کشت شده (بدون هم‌کشتی به‌عنوان کنترل) در روز اول ۰/۰۸±۰/۰۰۴۵ بود و پس از ۷۲ ساعت ۰/۰۹±۰/۰۰۵۴ بود و نسبت این دو ۱/۱۷±۰/۱۷ بود.

CD90 را کمتر گزارش کرده بودند؛ به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۸ اسکاوب (Schaweb) و همکاران مطالعه‌ای روی سلول‌های جداشده از آندومتر انسانی و سلول‌های استرومایی آندومتر انسانی کشت داده شده برای بررسی نشانگرهای ویژه سلول‌های مزانشیمی که یکی از این نشانگرها، نشانگر CD90 بود، انجام دادند؛ براساس نتیجه این بررسی ۸۷/۵ درصد از سلول‌ها نشانگر CD90 را در سلول‌های بنیادی آندومتر نشان دادند [۲۰] و نتایج ارایه شده توسط دیگر محققین نیز تقریباً مشابه بود [۱۹، ۲۱].

در سال ۲۰۰۶ مارچ (Maresch) و همکاران نیز در مطالعه‌ای روی سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان برای تعیین درصد نشانگر CD90 با استفاده از روش فلوسایتومتری نشان دادند که ۹۴/۲۶ درصد این سلول‌ها CD90 مثبت بودند [۲۲].

در بخش دیگر این تحقیق نشان داده شده است که سیستم هم‌کشتی لوله فالوپ موش به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده با سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی تأثیری بر میزان تکثیر آن‌ها نداشته است. در این خصوص می‌توان چندین عامل را دخیل دانست:

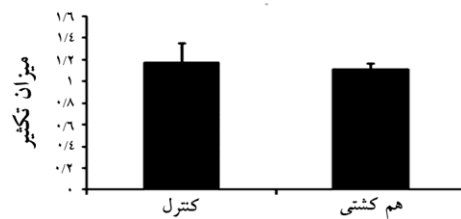
مقدار عوامل رشد از جمله LIF ترشح شده توسط سلول‌های لوله فالوپ موش در محیط کشت به اندازه کافی و مناسب نبوده است که باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی استرومای آندومتر انسانی شود.

از آن‌جا که برای متوقف کردن سلول‌های لوله فالوپ موش از میتومایسین C استفاده می‌شود معایبی در رابطه با غیر فعال کردن لایه پشتیبان با استفاده از میتومایسین C مطرح است [۲۳] که ممکن است مانع از ترشح LIF توسط سلول‌های لوله فالوپ شود. از جمله این‌که میتومایسین C باقی‌مانده در محیط کشت مانع تکثیر سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی تحت هم‌کشتی با سلول‌های لوله فالوپ موش شود. در همین ارتباط نشان داده شده که تیمار سلول‌های مختلف با میتومایسین C می‌تواند باعث افزایش آپوپتوز (مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده):

همچنین میزان میانگین ضریب جذب در سلول‌های آندومتر انسانی هم‌کشتی شده با لوله فالوپ موش در روز اول 0.05 ± 0.06 در روز سوم 0.06 ± 0.08 بود و نسبت این دو $1/1 \pm 0.02$ بود.

میزان میانگین ضریب جذب نوری در سلول‌های لوله فالوپ غیرفعال شده با میتومایسین C 0.059 ± 0.05 در روز سوم نسبت به میانگین میزان ضریب جذب روز صفر 0.058 ± 0.05 تقریباً ثابت بود. نسبت این دو $1/0.1 \pm 0.03$ بود.

میزان تکثیر سلول‌های آندومتر انسانی تحت هم‌کشتی با لوله فالوپ موش تغییر معنی‌داری با سلول‌های آندومتر کشت شده به تنهایی نداشت و همچنین تفاوت معنی‌داری در میزان تکثیر سلول‌های فالوپ پس از ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ دیده نشد ($P \leq 0.05$) (شکل ۴).



شکل ۴ مقایسه میزان تکثیر سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی در سیستم هم‌کشتی با سلول‌های لوله فالوپ موش و کنترل

بحث

نتایج نشان داد که در پاساژ چهارم سلول‌های آندومتر انسانی، درجه خلوص سلول‌های CD90 بسیار بالا است و نزدیک به ۹۴ درصد از سلول‌ها این نشانگر را نشان دادند که نشان می‌دهد درصد بالایی از سلول‌های جداسازی شده و کشت شده خصوصیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارد. به‌عبارت دیگر؛ می‌توان گفت در این پژوهش روش جداسازی و کشت سلول‌های آندومتر انسانی در این تحقیق، کارآیی بالایی داشته است. این در حالی است که یافته‌های به‌دست آمده توسط سایر پژوهشگران درصد خلوص سلول‌های

صورت پذیرد.

در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داده است که سیستم هم‌کشتی لوله فالوپ موش در زمان به کار گرفته شده در این تحقیق به‌منظور بهبود تکثیر سلول‌های بنیادی استرومای آندومتر انسانی روش مناسبی نیست و احتمال دارد در زمان کشت طولانی تر اثر متفاوتی بر روند تکثیر سلول‌های بنیادی استرومایی داشته باشد که نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح دانشکده علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و شبکه سلول‌های بنیادی انجام شده است.

(Apoptosis) در این سلول‌ها شود [۲۴، ۲۵].

شناسایی سلول به سلول که بر اساس تماس فیزیکی است نقش مهمی در ارتباط عملکردی بین دو سلول ایفا می‌کند که احتمال دارد این ارتباطات به درستی بین این دو گروه سلول برقرار نشده باشد [۲۶].

شرایط محیط کشت ممکن است شرایط بهینه‌ای برای هر دو نوع سلول یعنی سلول‌های لوله فالوپ موش و سلول‌های آندومتر انسانی نباشد [۲۷] و نیز سرم ممکن است دارای آثار منفی باشد [۲۸].

بنابراین بهتر است برای اثبات هر یک از این دلایل تحقیقات بیشتری صورت پذیرد؛ مثلاً آثار سیتوکین LIF به تنهایی بدون حضور سلول‌های لایه پشتیبان لوله فالوپ بررسی شود و نیز لازم است محیط کشت به شکل محیط فاقد سرم استفاده شود تا بتوان نتیجه‌گیری مناسب‌تری

منابع

- [1] Dimitrov R1, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 2008; 135(4): 551-8.
- [2] Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102(10): 3483-93.
- [3] Chan RW, Gargett CE. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1529-38.
- [4] Gargett CE, Chan RW, Schwab KE. Endometrial stem cells. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007; 19(4): 377-83.
- [5] Pittatore G, Moggio A, Benedetto C, Bussolati B, Revelli A. Endometrial adult/progenitor stem cells: pathogenetic theory and new antiangiogenic approach for endometriosis therapy. *Reprod Sci* 2014; 21(3): 296-304.
- [6] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 11): 2204-13.
- [7] Wang L, Yang X, Wang W. Isolation and identification of human endometrial stromal stem cells. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2013; 42(3): 311-8.
- [8] Gaafar T, Osman O, Osman A, Attia W, Hamza H, El Hawary R. Gene expression profiling of endometrium versus bone marrow-derived mesenchymal stem cells: upregulation of cytokine genes. *Mol Cell Biochem* 2014; 395(1-2): 29-43.
- [9] Alizadeh A, Moztafzadeh F, Ostad SN, Azami M, Geramizadeh B, Hatam G, Bizari D, Tavangar SM, Vasei M, Ai J. Synthesis of

- calcium phosphate-zirconia scaffold and human endometrial adult stem cells for bone tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2014. [Epub ahead of print]
- [10] Wolff EF, Gao XB, Yao KV, Andrews ZB, Du H, Elsworth JD, Taylor HS. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J Cell Mol Med* 2011; 15(4): 747-55.
- [11] Niknamasl A, Ostad SN, Soleimani M, Azami M, Salmani MK, Lotfibakhshaiesh N, Ebrahimi-Barough S, Karimi R, Roozafzoon R, Ai J. A new approach for pancreatic tissue engineering: human endometrial stem cells encapsulated in fibrin gel can differentiate to pancreatic islet beta-cell. *Cell Biol Int* 2014; 38(10): 1174-82.
- [12] Khademi F, Soleimani M, Verdi J, Tavangar SM, Sadroddiny E, Massumi M, Ai J. Human endometrial stem cells differentiation into functional hepatocyte-like cells. *Cell Biol Int* 2014; 38(7): 825-34.
- [13] Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(11): 818-34.
- [14] Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13(1): 9-14.
- [15] Vlad M, Walker D, Kennedy RC. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1996; 11(8): 1678-86.
- [16] Menezo YJ, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990; 42(2): 301-6.
- [17] Ghaffari M, Akhondi MM, Heidari M. Effects of different media on fallopian tube epithelial cells culture and human embryo development. *J Reprod Infertil* 2003, 4(1): 5-16.
- [18] Reinhart KC, Dubey RK, Mummery CL, van Rooijen M, Keller PJ, Marinella R. Synthesis and regulation of leukaemia inhibitory factor in cultured bovine oviduct cells by hormones. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(3): 301-8.
- [19] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009; 80(6): 1136-45.
- [20] Schwab KE, Hutchinson P, Gargett CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod* 2008; 23(4): 934-43.
- [21] Mobarakeh ZT, Ai J, Yazdani F, Sorkhabadi SM, Ghanbari Z, Javidan AN, Mortazavi-Tabatabaei SA, Massumi M, Barough SE. Human endometrial stem cells as a new source for programming to neural cells. *Cell Biol Int Rep* (2010) 2012; 19(1): e00015.
- [22] Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem* 2006; 97(4): 744-54.
- [23] Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K,

- Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(10): 971-4.
- [24] Zhou QM, Chen QL, Du J, Wang XF, Lu YY, Zhang H, Su SB. Synergistic effect of combinatorial treatment with curcumin and mitomycin C on the induction of apoptosis of breast cancer cells: a cDNA microarray analysis. *Int J Mol Sci* 2014; 15(9): 16284-301.
- [25] Shi K, Wang D, Cao X, Ge Y. Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in mitomycin C (MMC)-induced apoptosis in human fibroblasts via PERK pathway. *PLoS One* 2013; 8(3): e59330.
- [26] Ziparo E, Geremia R, Russo MA, Stefanini M. Surface interaction in vitro between Sertoli cells and germ cells at different stages of spermatogenesis. *Am J Anat* 1980; 159(4): 385-8.
- [27] Vanroose G, Van Soom A, de Kruif A. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod Domest Anim* 2001; 36(1): 25-8.
- [28] Hofmann MC. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 288(1-2): 95-103.