

## تمایز سلول‌های گرانولوزای فولیکول تخمدان انسانی به کراتینوسایت

مسعود ملکی<sup>۱</sup>، سید امین قریشی<sup>۲</sup>، مهروز دزفولیان<sup>۳</sup>، آرش عبدالملکی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۹/۰۹

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای می‌باشند که در بافت‌های مختلف یافت می‌شوند. این سلول‌ها دارای خصوصیت تقسیم و تمایز به انواع رده‌های سلولی هستند. سلول‌های گرانولوزا سلول‌های بنیادی چند توان می‌باشند. در این پژوهش توان تمایز سلول‌های بنیادی گرانولوزا به سلول‌های کراتینوسایت مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های گرانولوزا بعد از جداسازی آنزیمی از فولیکول تخمدان کشت داده شد، سپس محیط القاکننده‌ی کراتینوسایتی به محیط کشت اولیه اضافه گردید و بیان کراتین ۱۰ و کراتین ۱۴ به‌عنوان مارکرهای بیان کراتینوسایتی توسط تکنیک وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های استخراج‌شده نشان‌دهنده بیان بالای آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود ( $p < 0.05$ ). نتایج وسترن بلات نیز نشان‌دهنده بیان پروتئین‌های کراتین ۱۰ و کراتین ۱۴ در همه گروه‌ها غیر از کنترل منفی بود ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** سلول‌های گرانولوزای انسانی توان بسیار بالایی در تمایز به سلول‌های کراتینوسایتی دارند، و می‌توان با تحقیقات بیشتر، بستر مناسب را جهت استفاده از سلول‌های گرانولوزای انسانی برای درمان ضایعات شدید پوستی فراهم نمود.

**واژگان کلیدی:** کراتینوسایت، وسترن بلات، فلوسایتومتری، کراتین ۱۰، کراتین ۱۴، سلول‌های گرانولوزا

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره یازدهم، ص ۸۱۳-۸۲۲، بهمن ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۰۹۱۸۳۷۰۵۲۱۷

Email: ari\_1364@yahoo.com

### مقدمه

محافظت از نفوذ مواد مختلف و اثر اشعه ماوراءبنفش نگهداری می‌کند و به علت اختتام اعصاب حسی، به‌عنوان عضو لامسه نیز به کار می‌رود (۴).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه سلول‌های بنیادی نقش عمده‌ای را در زمینه ترمیم و بازسازی بافت‌ها و همچنین درمان برخی از بیماری‌های علاج‌ناپذیر از طریق پیوند این سلول‌های پرتوان با پتانسیل درمانی بالا بازی می‌کنند (۵). دو ویژگی متمایزکننده سلول‌های بنیادی از سایر رده‌های سلولی شامل توانایی آن‌ها در نوسازی منابع خود از طریق تقسیم میتوز و همچنین امکان تمایز به دیگر انواع سلول‌ها نقش بارز این سلول‌ها را در آینده پزشکی ترمیمی نشان می‌دهد. امروزه در پزشکی ترمیمی انواعی از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های بنیادی چربی، پوست، فولیکول

با توجه به افزایش روزافزون وسایل نقلیه موتوری همه‌روزه شاهد سوانح بسیاری در سطح جاده‌های کشور هستیم که متأسفانه در اکثر این تصادفات ضایعات و زخم‌های پوستی شدید و غیرقابل‌جبران اتفاق می‌افتد. همچنین ضایعاتی از قبیل سوختگی پوست با اسید و حرارت مشکلات فراوانی را پیش پای پزشکان و جراحان می‌گذارد. از این‌رو درمان ضایعات پوستی همواره معضلی برای جامعه جراحان پوست و زیبایی بوده است (۱-۳). به‌طور کلی پوست یک بافت پویا می‌باشد که تمام سطح بدن را از خارج می‌پوشاند و آن را در مقابل عوامل خارجی از جمله ممانعت از تبخیر آب، تنظیم الکتروولت‌ها،

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

<sup>۳</sup> گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

<sup>۴</sup> گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه فن آوری‌های نوین سبلان، نمین، ایران

است، کماکان تا استفاده فراگیر از این سلول‌ها در کلینیک مسیر طولانی در پیش است. وجود مارکرهای سلول‌های بنیادی در سلول‌های گرانولوزا موجب شده این سلول‌ها کاندید مناسبی در ترمیم پوست باشند. از این رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی توان تمایزی سلول‌های گرانولوزا به کراتینوسایت‌ها جهت کاربرد در بازسازی بافت‌های پوششی آسیب‌دیده می‌باشد.

### مواد و روش کار

پژوهش حاضر از نوع مداخله‌ای (تجربی و شبه تجربی) می‌باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی تبریز در طی سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. کلیه آزمایش‌ها با رعایت اصول اخلاقی مصوب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه و با کد اخلاقی شماره IR.AZUMS.REC.1393.522 انجام شده است. سلول‌های گرانولوزا پس از جدا شدن از تخمک در آزمایشگاه جنین‌شناسی دور انداخته می‌شوند، بنابراین طبق آئین‌نامه اخلاق در تحقیقات روی سلول‌های بنیادی مشکلی از نظر استفاده از این سلول‌ها وجود ندارد.

### استخراج سلول‌های گرانولوزا و پاساژ سلولی:

فولیکول رسیده تخمدان از طریق آسپیراسیون با استفاده از سونوگرافی ترانس واژینال به دست آمد و سلول‌های گرانولوزا با روش آنزیمی (آنزیم هیالورونیداز) جداسازی شده و بلافاصله به آزمایشگاه کشت سلول‌های بنیادی منتقل شدند (این قسمت توسط جنین‌شناس در آزمایشگاه جنین‌شناسی انجام گرفته و سپس سلول‌ها تحویل آزمایشگاه کشت سلول گردید) (۱۰، ۱۳). به‌طور خلاصه سلول‌های گرانولوزا بلافاصله پس از جداسازی وارد فالكون شدند. سپس به میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت همراه با ۲۰ درصد FBS به سلول‌ها اضافه گردید. محتویات فالكون در دور ۱۵۰۰ و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محیط رویی خارج شد. سپس محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۲۰ درصد FBS و آنتی‌بیوتیک ۱ درصد pen/strep تهیه گردید که ۴ میلی‌لیتر از آن وارد فلاسک کشت و ۱ میلی‌لیتر آن به روی سلول‌ها اضافه گردید. در ادامه سلول‌ها شمارش و وارد فلاسک شدند. سپس داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۹۸ درصد و ۵٪ CO<sub>2</sub> قرار داده شد. پس‌ازاینکه ۷۰ الی ۸۰ درصد سطح فلاسک توسط سلول‌ها پر شد، سلول‌ها پاساژ داده شدند.

### بررسی مارکرهای سطحی سلول‌ها و تعیین هویت سلول‌های بنیادی توسط فلوسایتومتری:

مو، بند ناف، گرانولوزای تخمک و مغز استخوان موردتوجه قرار دارند و به کار برده می‌شوند. از خصوصیات ویژه سلول‌های بنیادی جهت به‌کارگیری در کلینیک می‌توان به استحصال آسان، قابلیت گسترش و تکثیر مناسب در محیط کشت، توانایی زنده ماندن و لانه‌گزینی مناسب در بافت‌های بدن میزبان و عدم تومورزایی اشاره نمود (۶). در این میان، سلول‌های بنیادی گرانولوزای تخمک به‌راحتی از یک بافت کوچک قابل جداسازی می‌باشند و به‌سرعت با درجه خلوص بالا رشد می‌کنند و نیز جمعیت سلولی گرفته شده از یک فولیکول یکنواخت بوده و نیازی به مرحله‌ی خالص‌سازی نمی‌باشد. مضاف بر این‌که استفاده از آن‌ها منع اخلاقی و قانونی ندارد (۷، ۸).

Bukovsky و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند وقتی سلول‌های گرانولوزا در محیط آزمایشگاهی کشت داده می‌شوند، تغییر شکل داده و فنوتیپ فیبروبلاستی را نشان می‌دهند. علاوه بر آن بعد از استفاده از ترکیبی از پروژسترون، تستوسترون و استروژن در محیط کشت، سلول‌های گرانولوزای تازه کشت داده شده به سمت سلول‌های شبه نرونی تمایز می‌یابند (۹). De Geyter و همکارانش در سال ۲۰۰۹ برای اولین بار خاصیت چند توانی بودن سلول‌های گرانولوزا را در محیط کشت شناسایی کردند. در مطالعه‌ی آن‌ها سلول‌های گرانولوزا دو مورفولوژی اپی تلیالی و فیبروبلاستی را نشان دادند، حدود ۳ هفته بعد از کشت شکل اپی تلیالی سلول‌ها از بین رفت و فقط سلول‌های فیبروبلاستی باقی ماندند (۱۰). در مطالعه‌ی دیگری نیز بیان مارکرهای بنیادی در سلول‌های گرانولوزای خوک و نیز تمایز آن‌ها به سلول‌های استئوبلاستی توسط Mattioli و همکارانش مورد ارزیابی قرار گرفت (۸). همچنین بیان مارکرهای بنیادی در سلول‌های گرانولوزای انسانی توسط Michail Varras و همکارانش مورد بررسی و اثبات قرار گرفت، آن‌ها همچنین توانستند مارکرهای بنیادی OCT-4, CD29, CD44, CD90, CD105, CD117, CD166 را شناسایی کنند. علاوه بر این بیان مارکر OCT-4 را بر اساس پارامترهایی مانند سن، توده‌ی بدنی، علت نازایی، سطح پایه‌ی سرمی FSH, LH و تعداد فولیکول‌های آسپیره شده مورد بررسی قرار دادند (۱۱).

Irene Ellia و همکارانش در سال ۲۰۱۳ برای تأیید آنکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون در محیط کشت غنی‌شده اختصاصی قابلیت تمایز به لاین سلولی اپیتلیالی را در شرایط *in vitro* دارند، پنسیتوکراتین ۲ و سایتوکراتین ۱۹۳ را رنگ‌آمیزی کردند که نتایج مثبتی با استفاده از ایمونوهیستوشیمی نشان دادند و توانایی این سلول‌ها را برای تمایز به کراتینوسایت اثبات کردند (۱۲).

علیرغم پیشرفت‌های چشمگیری که در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت به دست آمده

مورد استفاده قرار گرفت. زمانی که الکتروفورز ژل اکریل امید به پایان رسید، ژل از کاست خارج گردید و Stacking gel از ژل اصلی جدا شد. ژل با استفاده از بافر الکتروفورز شستشو داده شد و ژل در ظرفی حاوی western blotting Transfer buffer به مدت نیم ساعت قرار داده شد. در این مدت کاغذ نیتروسولولز به آرامی در آب مقطر خیس شده و به مدت ۱۵ دقیقه در داخل Transfer buffer قرار داده شد و کاغذهای صافی واتمن نیز داخل ترانسفر بافر خیسانده شدند. سپس داخل ظرفی شیشه‌ای مقداری ترانسفر بافر ریخته و کاست ساندویچ و سترن بلات داخل آن قرار داده شد. اسفنج‌های ساندویچ نیز داخل ظرف کامل خیسانده شدند. پس از اتمام سر هم کردن ساندویچ و سترن بلات آن را برداشته و در حالیکه ژل به طرف قطب منفی دستگاه است، وارد تانک و سترن بلات شد. داخل تانک با محلول Transfer buffer پر شده و به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۱۲۰ - ۹۰ ولت عمل انتقال انجام گرفت. پس از پایان عمل انتقال پروتئین‌ها از ژل به روی کاغذ نیتروسولولز، ساندویچ باز شده و کاغذ نیتروسولولز به مدت یک ساعت در بافر بلوکه کننده قرار داده شد. پس از اتمام زمان بلوکه کردن کاغذ نیترو سلولز، آنتی بادی اولیه به میزان ۱:۱۰۰۰ در محلول بلوکه کننده رقیق شده و روی کاغذ نیترو سلولز ریخته شد. ظرف حاوی کاغذ نیترو سلولز با آنتی بادی اولیه، روی شیکر قرار گرفت و به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اتمام زمان ۱۲ ساعته کاغذ نیترو سلولز چند بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با محلول TBST شستشو داده شد و سپس آنتی بادی ثانویه به میزان ۱:۷۰۰۰ در محلول بلوکه کننده رقیق شده و روی کاغذ نیترو سلولز اضافه شد و در دمای اتاق به مدت یک ساعت ظرف حاوی کاغذ نیترو سلولز روی شیکر قرار گرفت. پس از چند مرحله شستشو کاغذ نیترو سلولز در معرض western blotting Luminal reagent (sc- 2048, (Santa Cruze Biotechnology) قرار داده شد و بعد از آن کاغذ نیتروسولولز در اتاق تاریک در کنار فیلم X-Ray قرار داده شد، سپس لکه‌های ظاهر شده توسط نرم افزار Image-J نسخه ۱/۴۴ مورد آنالیز قرار گرفت.

#### آنالیز آماری

برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار (spss) ویراست ۱۶ و برای تحلیل واریانس از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد. همچنین آنالیزهای و سترن بلات توسط نرم افزار Image-J نسخه ۱/۴۴ انجام شد. سطح معنی داری ( $p < 0.05$ ) به‌عنوان مرز استنتاج آماری قرار داده شد.

پس از اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، به‌منظور اثبات بنیادی بودن، مارکرهای سطحی CD105، CD166، CD44، Anti-stro 1، CD19، CD106، CD90، CD146 و CD45 توسط تکنیک فلوسایتومتری بررسی شد. به‌طور خلاصه، برای بررسی مارکرهای سطحی از سلول‌های گرانولوزا در پاساژ سوم استفاده گردید. پس از پاساژ سلول‌ها تریپسینه شده و سانتریفیوژ شدند. سپس سلول‌ها به محیط حاوی D-PBSA به همراه ۱ درصد FBS منتقل شدند. سلول‌ها در ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی اولیه (ratios 1:100) در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها در دور ۱۲۰۰ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و با بافر شستشوی فلوسایتومتری شستشو داده شد و آنتی بادی ثانویه اضافه گردید و فالكون‌ها در  $40^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شدند. و بدنبال آن شستشو داده شده و با دستگاه و نرم افزار تجزیه و تحلیل کننده فلوسایتومتری (BD FACSCalibur) مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۴).

#### القای تمایز سلول‌های گرانولوزا:

محیط کشت سلول‌های گرانولوزا پس از تهیه ردهی سلولی، وقتی حدود ۸۰ درصد فلاسک کشت را پر نمودند، تعویض شده و محیط کشت القایی کراتینوسایتی با غلظت‌های ۱۰۰ نانومولار و ۲۰۰ نانومولار جایگزین گردید. القا در چهار گروه زمانی مختلف ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز انجام شد. محیط هر ۴ روز یکبار تعویض شده و در هر بازه‌ی زمانی نمونه‌های مورد نیاز بعد از لیز سلولی جهت انجام تکنیک و سترن بلات برداشته شده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### روش بردفورد برای اندازه گیری غلظت پروتئین:

به‌منظور اثبات وجود پروتئین در نمونه‌ها، طیف جذبی آن‌ها توسط اسپکتروفوتومتر در محدوده UV-visible اندازه گیری شد. بدنبال آن میزان پروتئین هریک از محلول‌ها توسط روش پروتئین سنجی بردفورد محاسبه گردید. بطور خلاصه، ابتدا به میزان ۱۰ میکرولیتر از عصاره سلولی بر داشته شد و با  $\text{NaCl } 0.15$  مولار به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در ادامه میزان ۱ میلی‌لیتر رنگ کوماسی بلو به آن اضافه گردید. پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس غلظت پروتئین برای همه‌ی نمونه‌ها به دست آمد.

#### تکنیک و سترن بلات:

در این تکنیک آنتی بادی اولیه شامل Anti-krt10 (origene-)، RbpAb to cytokeratin14 (abcam-) و Goat anti-rabbit IgG-FITC (Ab175549) و آنتی بادی ثانویه

## یافته‌ها

## نتایج ارزیابی سلول‌ها از لحاظ ویژگی‌های رشد و مورفولوژی:

سلول‌های گرانولوزا پس از کشت به بستر ظرف چسبیده و از نظر مورفولوژیکی پس از ۷ روز ظاهری دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی را ایجاد کردند. ظاهر دوکی شکل و قابلیت اتصال به بستر کشت از ویژگی‌های متمایزکننده سلول‌های بنیادی مزانشیمی و وجه افتراق آن‌ها با سلول‌های هماتوپوئیتیک است (شکل ۱).

## نتایج بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی با تکنیک فلوسایتومتری

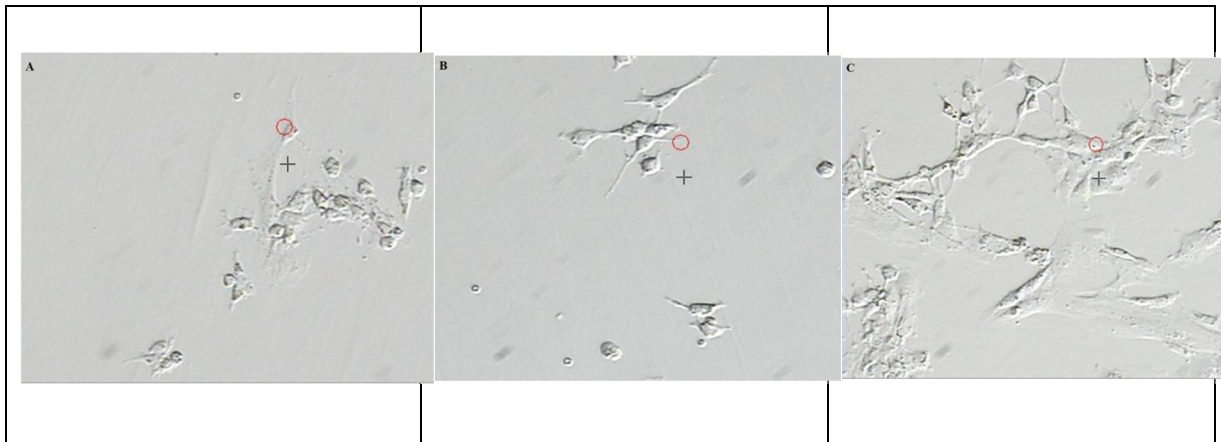
بدین منظور الگوی بیان آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های استخراج شده با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی توسط تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده بیان بالای آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود. به‌طوری که سلول‌ها آنتی‌ژن‌های سطحی CD44، CD166، CD105، CD146، CD90، CD106 و Anti-stro 1 را بیان کردند. در مقابل آنتی‌ژن‌های CD19 و CD45 را بیان نکردند. در مجموع نتایج بدست آمده بیانگر درجه خلوص مناسب سلول‌های استخراج شده و تأییدی بر ماهیت مزانشیمی و بنیادی بودن این سلول‌ها بود.

## نتایج حاصل از بررسی شکل ظاهری سلول‌های القا شده:

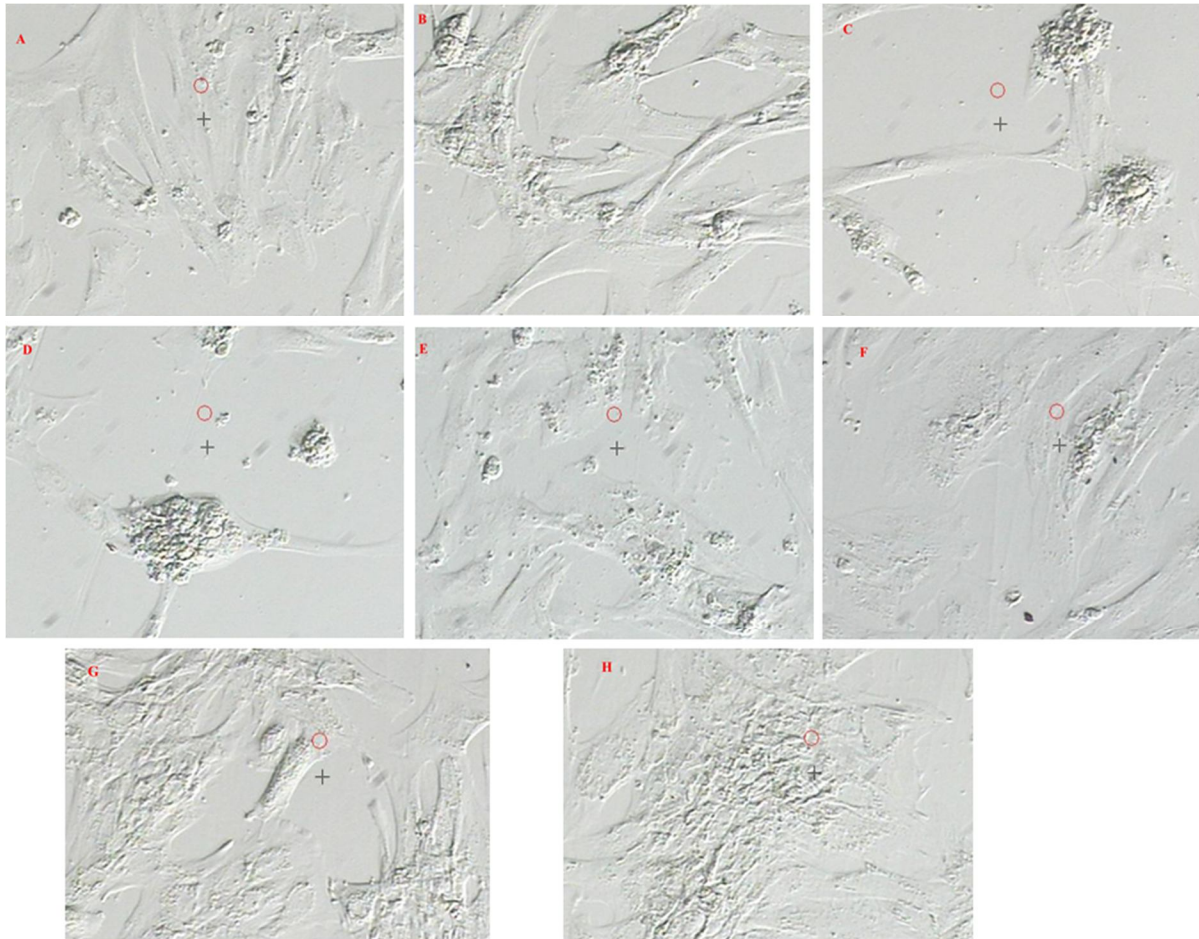
سلول‌ها پس‌ازاینکه در بازه‌های زمانی متفاوت و با غلظت‌های مختلف القا شدند، از نظر تغییرات شکل ظاهری سلول‌ها در حین القا مورد بررسی قرار گرفتند، بررسی میکروسکوپی سلول‌ها حاکی از آن است که هر چه مدت‌زمان القا بیشتر می‌شود، توده‌هایی در داخل سلول‌ها پدید می‌آیند که نشانه‌ای از تغییرات تمایزی در آن‌ها می‌باشد (شکل ۲).

## نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات:

نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات نشان داد کراتین ۱۰ که از خانواده‌ی سایتوکراتین نوع I می‌باشد و در اسکلت سلولی کراتینوسایت نقش ایفا می‌کند در همه‌ی گروه‌های مورد نظر به غیر از گروه کنترل منفی بیان شد (شکل ۳، نمودار ۱). کراتین ۱۴ نیز که به‌عنوان یک هتروداپمر با کراتین ۵ نوع II می‌باشد و در شکل‌گیری اسکلت سلولی کراتینوسایتی نقش دارد، در همه‌ی گروه‌ها به غیر از گروه کنترل منفی بیان داشت (شکل ۴، نمودار ۲). همچنین در مقایسه بین گروه‌های مختلف داده‌ها نشان داد که در ارتباط با کراتین ۱۰ گروه‌های تیمار شده با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار در هفته دوم اختلاف بیشتری در میزان بیان با گروه کنترل نشان دادند (نمودار ۱). همچنین داده‌های حاصل از تیمار با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار در ارتباط با کراتین ۱۴ در هفته چهارم اختلاف بیشتری در میزان بیان با گروه کنترل نشان دادند (نمودار ۲).



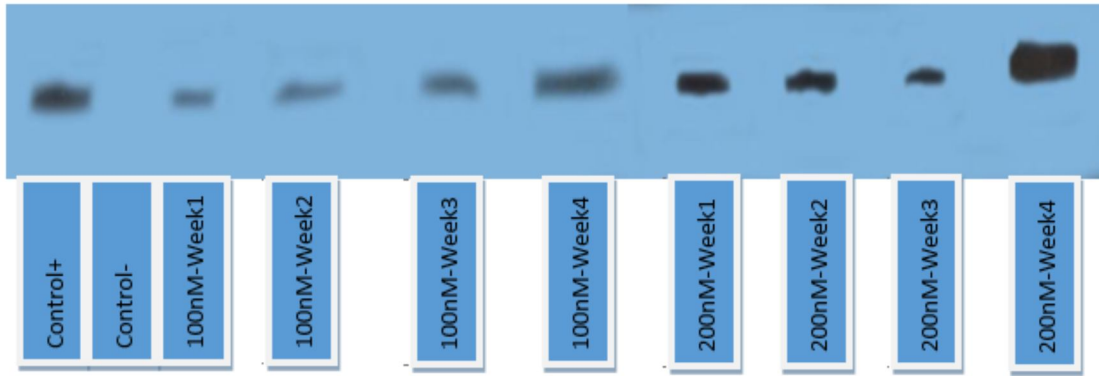
شکل (۱): سلول‌های گرانولوزای استخراج شده از فولیکول تخمدانی پس از گذشت یک روز از شروع کشت (A)، افزایش تعداد سلول‌ها پس از گذشت سه روز (B)، تراکم سلولی یک هفته پس از گذشت شروع کشت (C) بزرگنمایی X ۱۰۰.



**شکل (۲):** القای سلول‌های گرانولوزا با دوز ۱۰۰ نانومولار القاکننده پس از گذشت یک هفته (A)، دوهفته (B)، سه هفته (C)، چهار هفته (D)، القای سلول‌های گرانولوزا با دوز ۲۰۰ نانومولار القاکننده پس از گذشت یک هفته (E)، دوهفته (F)، سه هفته (G)، چهار هفته (H) بزرگنمایی ۱۰۰ X. همانطور که در تصاویر دیده می‌شود هر چه مدت‌زمان القا بیشتر می‌شود، توده‌هایی در داخل سلول‌ها دیده می‌شود که نشانه‌ای از تغییرات تمایزی در آن‌ها می‌باشد.

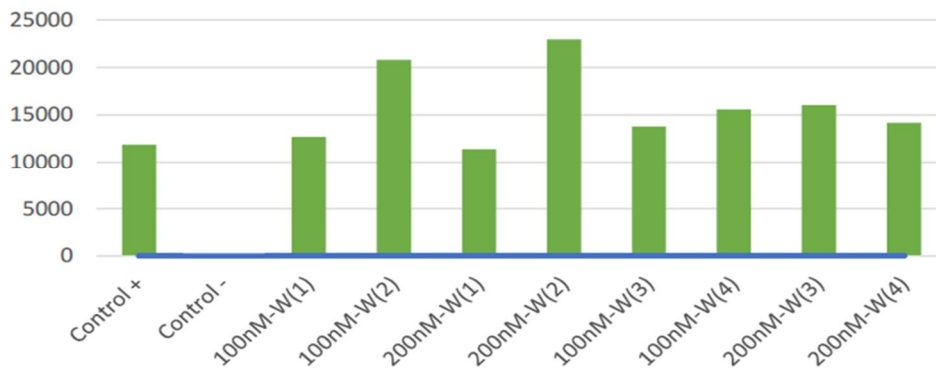


**شکل (۳):** بررسی بیان پروتئین کراتین ۱۰ در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک وسترن بلات



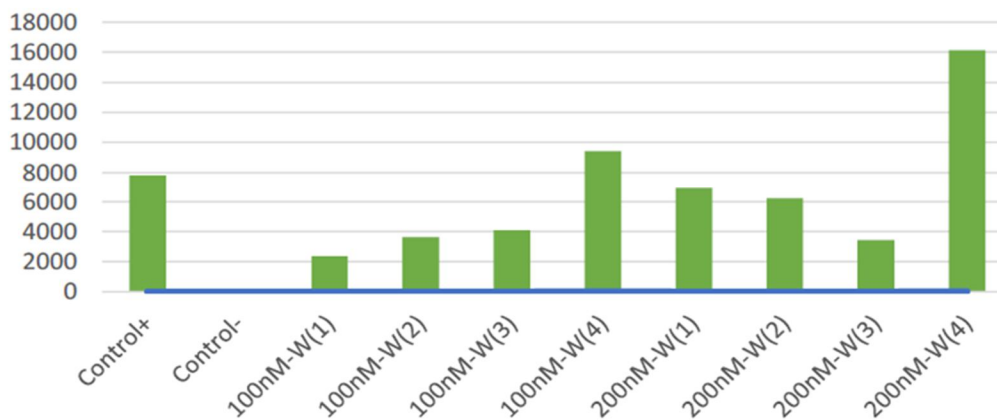
شکل (۴): بررسی بیان پروتئین کراتین ۱۴ در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک وسترن بلات

### Keratin 10



نمودار (۱): منحنی حاصل از نتیجه‌ی وسترن بلات پروتئین کراتین ۱۰ با استفاده از نرم افزار ImageJ بیان این پروتئین را در تمام گروه‌ها غیر از گروه کنترل منفی نشان می‌دهد. حرف W در نمودار فوق نشان‌دهنده‌ی هفته و عدد آن نشان‌دهنده‌ی تعداد هفته‌های تیمار می‌باشد.

### Keratin 14



نمودار (۲): منحنی حاصل از نتیجه‌ی وسترن بلات پروتئین کراتین ۱۴ با استفاده از نرم افزار ImageJ بیان این پروتئین را در تمام گروه‌ها غیر از گروه کنترل منفی نشان می‌دهد. حرف W در نمودار فوق نشان‌دهنده‌ی هفته و عدد آن نشان‌دهنده‌ی تعداد هفته‌های تیمار می‌باشد.

**بحث و نتیجه‌گیری**

سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی چند توان می‌باشند که از سلول‌های اجدادی مزودرمی مشتق شده‌اند که توانایی تمایز به انواع رده‌های سلولی از جمله: آدیپوسیت، استخوان، غضروف و غیره را دارند و در زمینه‌های مختلف همچون علوم زیستی و پزشکی مانند ارتقا کیفیت درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶، ۱۵). به دلیل کاربرد گسترده از سلول‌های بنیادی با منشأ مختلف در پزشکی ترمیمی، مطالعات بیولوژیکی تکوینی، تحقیق و توسعه داروسازی و سایر موارد کاربردی جداسازی، تخلیص و تعیین هویت این سلول‌ها حائز اهمیت است (۱۶).

در این مطالعه سلول‌های گرانولوزا پس از ۷ روز از کشت اولیه در شرایط آزمایشگاهی ظاهری دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی که از جمله شکل‌های نشان‌دهنده سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت نرمال می‌باشد را ایجاد کردند، پژوهش‌های پیشین نیز در ارتباط با شکل سلول‌ها پس از کشت این مطلب را تأیید می‌نمایند (۱۰، ۱۷). کل مدت زمان کشت در این پژوهش و مطالعه سلول‌های گرانولوزا در محیط آزمایشگاهی حدود ۱۷ روز طول کشید که بیانگر موفقیت در کشت طولانی مدت می‌باشد که مشابه نتیجه‌ی مطالعه‌ی Geyter و همکارانش می‌باشد (۱۰).

سلول‌ها پس از القا در مسیر کراتینوسایت عصاره‌گیری شده و تعیین غلظت شدند و با استفاده از تکنیک وسترن بلات دو ژن کراتینوسایتی کراتین ۱۰ و کراتین ۱۴ مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده از وسترن بلات و تجزیه و تحلیل آن مشخص شد سلول‌های گرانولوزا از همان هفته‌ی اول تیمار، به کراتینوسایتی تمایز پیدا می‌کنند. در نمودارهای به دست آمده بیان پروتئین‌های کراتین ۱۰ و کراتین ۱۴ در تمام گروه‌های تیمار به میزان قابل قبولی اثبات گردید، که اثبات‌کننده‌ی توانایی تمایز سلول‌های گرانولوزای انسانی به کراتینوسایت می‌باشد. در مطالعه‌ی دیگر Chavez و همکارانش توانستند سلول‌های بنیادی چربی گرفته شده از انسان را به سلول‌های شبه کراتینوسایتی تمایز دهند. در مطالعه‌ی که آن‌ها انجام دادند، بیان مارکرهای CD90 و CD105 مثبت بوده و بیان مارکرهای CD31 و CD45 منفی گزارش شدند. در برخی مطالعات قبلی بیان CD34 در سلول‌های

گرانولوزا مثبت گزارش شده است (۱۸، ۱۹). آن‌ها برای اولین بار نشان دادند که سلول‌های بنیادی چربی توانایی تمایز به سلول‌های شبه کراتینوسایتی را دارند. علاوه بر این، ثابت کردند که سلول‌های تمایز یافته‌ی شبه کراتینوسایتی مارکرهای ویژه‌ی کراتینوسایتی را بیان می‌کنند (۲۰).

در پژوهش دیگری Fujita و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک انسانی تحت تأثیر محیط القایی به سلول‌های کراتینوسایت تمایز می‌یابد و کراتین ۱۴ را بیان می‌کند (۲۱). همچنین Mortier و همکارانش موفق به ساخت یک مدل مشابه پوست از سلول‌های بند ناف انسان شده‌اند، که مخلوطی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های هماتوپوئیک می‌باشد، اما معتقد بودند که سلول‌های هماتوپوئیک به‌ندرت به سلول‌های کراتینوسایتی تمایز می‌یابند و منبع بیشتر سلول‌های کراتینوسایتی حاصل شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد (۲۲). پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که CTACK / CCL27 با تجمع سلول‌های دندریتیک مشتق از مغز استخوان سرعت ترمیم پوست را افزایش می‌دهد (۲۳).

در مجموع این نتایج حاکی از آن است که سلول‌های گرانولوزای انسانی توان بسیار بالایی در تمایز به سلول‌های کراتینوسایتی دارند، و می‌توان با تحقیقات بیشتر، بستر مناسب را جهت استفاده از سلول‌های گرانولوزای انسانی برای درمان ضایعات شدید پوستی که قابل درمان با روش‌های کنونی نیستند، فراهم کرد. همچنین سلول‌های گرانولوزا توان تکثیر و تمایز به سایر رده‌های سلولی در محیط آزمایشگاهی را دارند، از این رو می‌توان از این سلول‌ها به‌عنوان کاندیدی برای سلول درمانی، در مطالعات آینده استفاده نمود.

**محدودیت‌های مطالعه:**

از محدودیت‌های این کار می‌توان به تمایز سلول‌های گرانولوزا به سایر رده‌های سلولی اشاره کرد.

**تشکر و قدردانی**

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج است که با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد کرج انجام شده است.

**تعارض در منافع:** برای مقاله‌ی حاضر تعارض در منافع وجود نداشت.

**References:**

1. Uitto J, Pulkkinen L. Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. *Mol Biol Rep* 1996;23(1):35-46.
2. De Luca M, Tamura RN, Kajiji S, Bondanza S, Rossino P, Cancedda R, et al. Polarized integrin mediates human keratinocyte adhesion to basal lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(17):6888-92.

3. Liu Y, Panayi AC, Bayer LR, Orgill DP. Current Available Cellular and Tissue-Based Products for Treatment of Skin Defects. *Adv Skin Wound Care* 2019;32(1):19-25.
4. Yazawa K, Malay AD, Masunaga H, Numata K. Role of skin layers on mechanical properties and supercontraction of spider dragline silk fiber. *Macromol Biosci* 2019;19(3):180-9.
5. Brower J, Blumberg S, Carroll E, Pastar I, Brem H, Chen W. Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds. *Adv Skin Wound Care* 2011;24(11):524-32.
6. Ghayour MB, Abdolmaleki A, Fereidoni M. Use of Stem Cells in the Regeneration of Peripheral Nerve Injuries: an Overview. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam* 2015; 3(1):84-98.
7. Haack-Sorensen M, Friis T, Bindslev L, Mortensen S, Johnsen H, Kastrup J. Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68(3):192-203.
8. Mattioli M, Gloria A, Turriani M, Berardinelli P, Russo V, Nardinocchi D, et al. Osteo-regenerative potential of ovarian granulosa cells: an in vitro and in vivo study. *Theriogenology* 2012;77(7):1425-37.
9. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M. Steroid-mediated differentiation of neural/neuronal cells from epithelial ovarian precursors in vitro. *Cell Cycle* 2008;7(22):3577-83.
10. Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C, De Geyter M, Martin I, Holzgreve W, Scherberich A, et al. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem Cells* 2009;27(1):210-9.
11. Varras M. Clinical significance of expression of stem cell markers in human ovarian luteinized granulosa cells during assisted reproduction technologies. *Reprod Sys Sex Disord* 2012;1(4): 211-6.
12. Bishai IEM, El Ansary MS, Shaheen NMH, Farid RJ. Mesenchymal stem cell separation from Wharton's jelly and its differentiation into keratinocytes. *Comp Clin Path* 2013;22(4):547-53.
13. Leoni GG, Naitana S. Ovine Granulosa Cells Isolation and Culture to Improve Oocyte Quality. *Epitl Cell Cult* 2018;21: 95-106.
14. Maleki M, Ghanbarvand F, Behvarz MR, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cell* 2014;7(2):118-23.
15. Dzafic E, Stimpfel M, Virant-Klun I. Plasticity of granulosa cells: on the crossroad of stemness and transdifferentiation potential. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(10):1255-61.
16. Ganjibakhsh M, Shahzadeh Fa, Gohari Ns, Rahmati H ,Elyasi Gz, Izadpanah M, et al. isolation, characterization and standard storage of human mesenchymal stem cell derived from adipose and dental pulp tissue. *Razi Journal of Medical Sciences* 2017;24:35-50.
17. Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Biosynthesis, characterization and evaluation of the supportive properties and biocompatibility of DBM nanoparticles on a tissue-engineered nerve conduit from decellularized sciatic nerve. *Regen Ther* 2020; 14:315-21.
18. Baer PC, Kuçi S, Krause M, Kuçi Z, Zielen S, Geiger H, et al. Comprehensive phenotypic characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology. *Stem Cells Dev* 2012;22(2):330-9.
19. Lin C-S, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy* 2012;14(10):1159-63.
20. Bühring HJ, Battula VL, Tremel S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* 2007;11:262-71.



21. Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, et al. Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. *Clin Exp Dermatol* 2012;37(6):658-64.
22. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425:836-43.
23. Inokuma D, Abe R, Fujita Y, Sasaki M, Shibaki A, Nakamura H, et al. CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes. *Stem Cells* 2006;24:281-9.

## DIFFERENTIATION OF HUMAN OVARIAN FOLLICULAR GRANULOSA CELLS INTO KERATINOCYTES

Masoud Maleki<sup>1</sup>\*, Seyed Amin Ghoreishi<sup>2</sup>, Mahrouz Dezfoulian<sup>2</sup>, Arash Abdolmaleki<sup>3,4</sup>

Received: 18 July, 2020; Accepted: 28 November, 2020

### Abstract

**Background & Aims:** Stem cells are undifferentiated cells and are found in different tissues. These cells have capacity of self-renewal and differentiation into other lineages. Granulosa cells (GCs) are the multipotent stem cells. In the present research we evaluated the differentiation potential of GCs into keratinocytes.

**Material & Methods:** GCs were cultured after enzymatic isolation from ovarian follicle. Then, keratinocyte inductive medium was added and expression of keratin10 and keratin14 were investigated with western blotting technique.

**Results:** The results of the flow cytometric analysis of the isolated cells indicated the high expression of mesenchymal stem cell specific antigens ( $p < 0.05$ ). Also, the results of the western blotting showed the expression of creatine 10 and creatine 14 proteins in all groups except for negative control ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Human granulosa cells have a very high ability to differentiate into keratinocytic cells, and with further research, it is possible to provide a suitable substrate for the use of human granulosa cells to treat severe skin lesions.

**Keywords:** Keratinocyte, Western blotting, Flow cytometry, Keratin10, Keratin14, Granulosa cells

**Address:** Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

**Tel:** +989183705217

**Email:** ari\_1364@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(11): 822 ISSN: 2717-008X

<sup>1</sup> Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Department of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran

<sup>4</sup> Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, Sabalan University of Advanced Technologies (SUAT), Namin, Iran