تمایز سلول‌های گرانولوزای فولیکول تخمدان انسانی به کراتینوسایت

مسعود ملکی[۱]، سید امین قریشی[۲]، مهروز دزفولیان[۲]، آرش عبدالملکی[۳،٤]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰٤/۲۸ 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 تمایزی 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 موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های استخراج‌شده نشان‌دهنده بیان بالای آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود ($p<۰/۰۵$). نتایج وسترن بلات نیز نشان‌دهنده بیان پروتئین‌های کراتین ۱۰ و کراتین ۱۴ در همه گروه‌ها غیر از کنترل منفی بود ($p<۰/۰۵$).

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 ۸۲۲-۸۱۳، بهمن ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۹۱۸۳۷۰۵۲۱۷

Email: ari_1364@yahoo.com

مقدمه

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. ازاین‌رو درمان ضایعات پوستی همواره معضلی برای جامعه جراحان پوست و زیبایی بوده است(۱-۳). به‌طورکلی پوست یک بافت پویا می‌باشد که تمام سطح بدن را از خارج می‌پوشاند و آن را در مقابل عوامل خارجی ازجمله ممانعت از تبخیر آب، تنظیم الکترولیت‌ها، 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 علاج ناپذیر 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 ازجمله سلول‌های بنیادی چربی، پوست، فولیکول

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

[۳] گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

[٤] گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه فن آوری های نوین سبلان، نمین، ایران

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 لانه گزینی 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 نورونی 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 موردبررسی 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 موردبررسی قرار دادند(۱۱).

Irene Ellia و همکارانش در سال 2013 برای تأیید آنکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از ژله وارتون در محیط کشت غنی‌شده اختصاصی قابلیت تمایز به لاین سلولی اپیتلیالی را در شرایط in vitro دارند، پنسیتوکراتین 2 و سایتوکراتین 193 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 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 درترمیم پوست باشند. ازاین‌رو، 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 ازنظر 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 فالکون شدند. سپس به میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت همراه با ۲۰درصد FBS به سلول‌ها اضافه گردید. محتویات فالکون 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 ۲۰درصد FBS و آنتی‌بیوتیک ۱درصد 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 ۹۸درصد و CO2 5% 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:

پس از اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، به‌منظور اثبات بنیادی بودن، مارکرهای سطحی CD44، CD166، CD105، CD146،CD90،CD106، Anti-stro 1، CD19 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 ۱درصد FBS منتقل شدند. سلول‌ها در ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی اولیه (ratios 1:100) در دمای $^{\circ}C$ ۴ 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 فالکون‌ها در $^{\circ}C$ ۴۰ به مدت ۴۵ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شدند. و بدنبال آن شستشو داده شده و با دستگاه و نرم افزارتجزیه‌وتحلیل کننده‌ی فلوسایتومتری (BD FACSCalibur) مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۴).

القای تمایز سلول‌های گرانولوزا:

محیط کشت سلول‌های گرانولوزا پس از تهیه رده‌ی سلولی، وقتی حدود ۸۰درصد فلاسک کشت را پر نمودند، تعویض شده و محیط کشت القایی کراتینوسایتی با غلظت‌های ۱۰۰ نانومولار و ۲۰۰ نانومولار جایگزین گردید. القا درچهار 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 وسترن 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 NaCl ۰/۱۵ 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 وسترن بلات:

در این تکنیک آنتی‌بادی اولیه شامل Anti-krt10 (origene-TA308915) و RbpAb to cytokeratin14 (abcam-Ab175549) و آنتی بادی ثانویه Goat anti-rabbit IgG-FITC مورد استفاده قرار گرفت. زمانی که الکتروفورز ژل اکریل آمید به پایان رسید، ژل از کاست خارج گردید و Stacking gel از ژل اصلی جدا شد. ژل با استفاده از بافرالکتروفورز شستشو داده شد و ژل در ظرفی حاوی western blotting Transfer buffer به مدت نیم ساعت قرار داده شد. در این مدت کاغذ نیتروسلولز 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 وسترن بلات داخل آن قرار داده شد. اسفنج‌های ساندویچ نیز داخل ظرف کامل خیسانده شدند. پس از اتمام سر هم کردن ساندویچ وسترن بلات آن را برداشته و در حالیکه ژل به طرف قطب منفی دستگاه است، وارد تانک وسترن 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 نیتروسلولز، ساندویچ باز شده و کاغذ نیتروسلولز 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 نیتروسلولز 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 وسترن بلات توسط نرم افزار Image-J نسخه ۱/۴۴ انجام شد. سطح معنی داری ($p<۰/۰۵$) به‌عنوان مرز استنتاج آماری قرار داده شد.

یافته‌ها

نتایج ارزیابی سلول‌ها از لحاظ ویژگی‌های رشد و مورفولوژی:

سلول‌های گرانولوزا پس از کشت به بستر ظرف چسبیده و ازنظر 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 هماتوپوئتیک است (شکل ۱).

نتایج بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی با تکنیک فلوسایتومتری

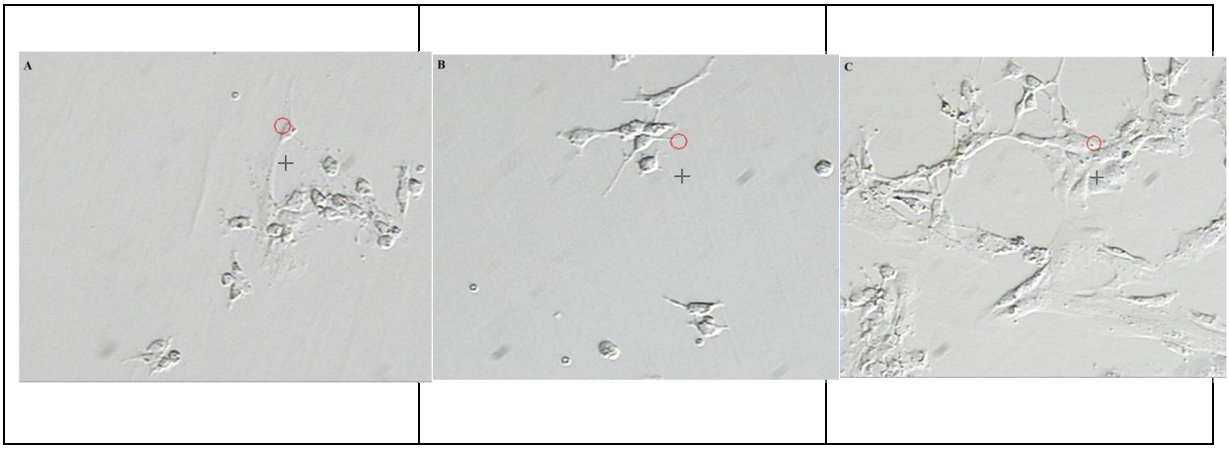
بدین منظور الگوی بیان آنتی ژن‌های سطحی سلول‌های استخراج شده با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی توسط تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده بیان بالای آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود. به‌طوری که سلول‌ها آنتی ژن‌های سطحی CD44، CD166، CD105، CD106،CD90،CD146 و Anti-stro 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 تائیدی بر ماهیت مزانشیمی و بنیادی بودن این سلول‌ها بود.

نتایج حاصل از بررسی شکل ظاهری سلول‌های القا شده:

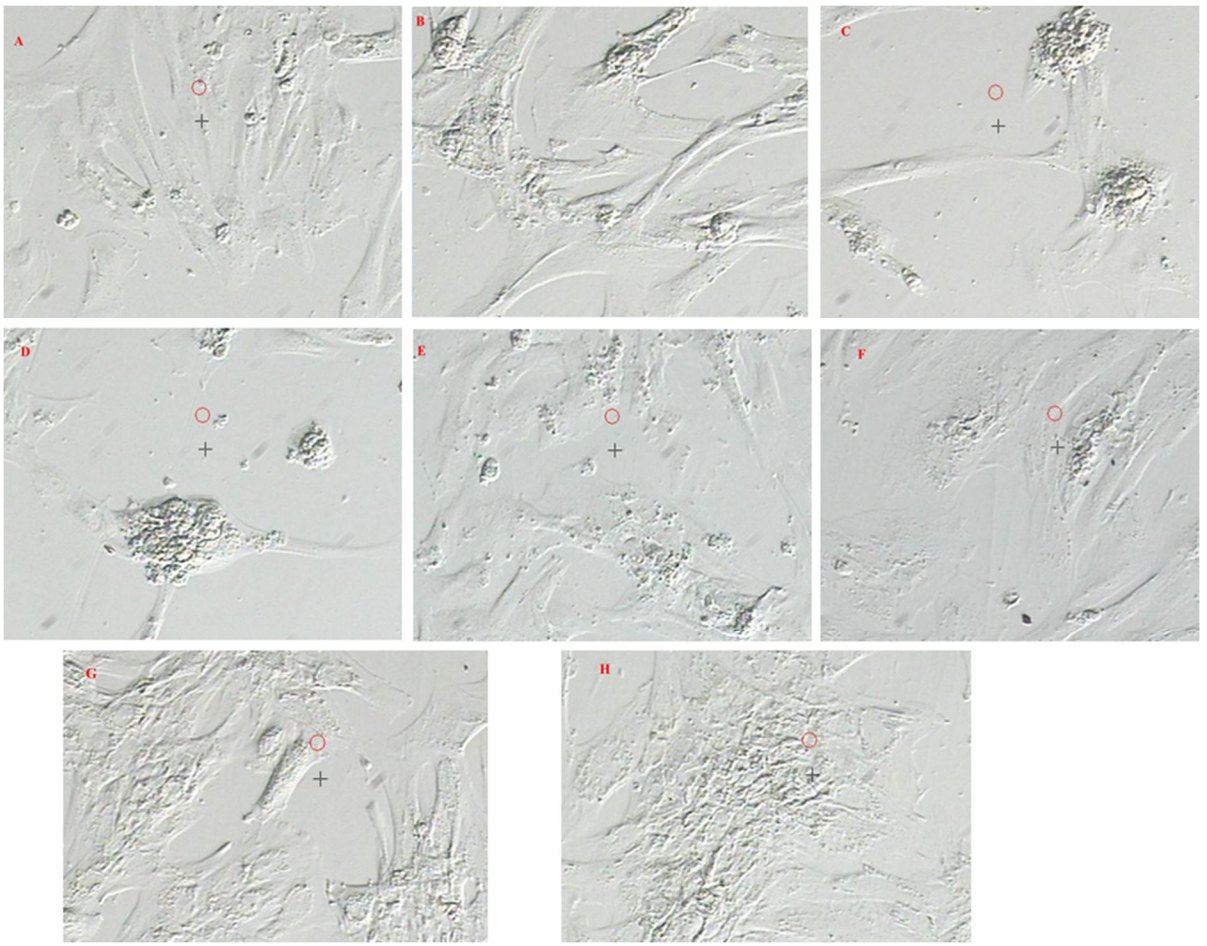
سلول‌ها پس‌ازاینکه در بازه‌های زمانی متفاوت و با غلظت‌های مختلف القا شدند، ازنظر تغییرات شکل ظاهری سلول‌ها در حین القا مورد بررسی قرار گرفتند، بررسی میکروسکوپی سلول‌ها حاکی از آن است که هر چه مدت‌زمان القا بیشتر می‌شود، توده‌هایی در داخل سلول‌ها پدید می‌آیند که نشانه‌ای از تغییرات تمایزی در آن‌ها می‌باشد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

نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات:

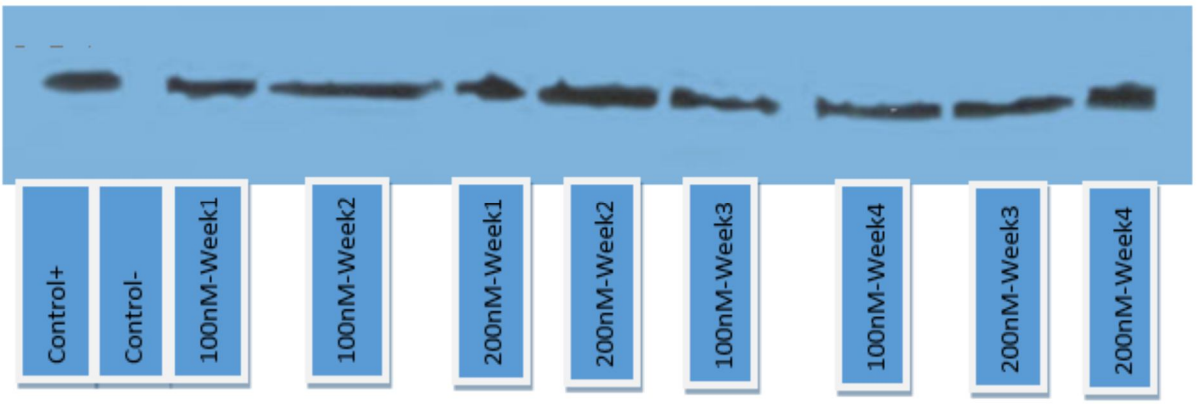
نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات نشان داد کراتین ۱۰ که از خانواده‌ی سایتوکراتین نوع I می‌باشد و در اسکلت سلولی کراتینوسایت نقش ایفا می‌کند در همه‌ی گروه‌های مورد نظر به غیر از گروه کنترل منفی بیان شد (شکل ۳، نمودار ۱). کراتین ۱۴ نیز که به‌عنوان یک هترودایمر با کراتین ۵ نوع II می‌باشد و در شکل گیری اسکلت 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).



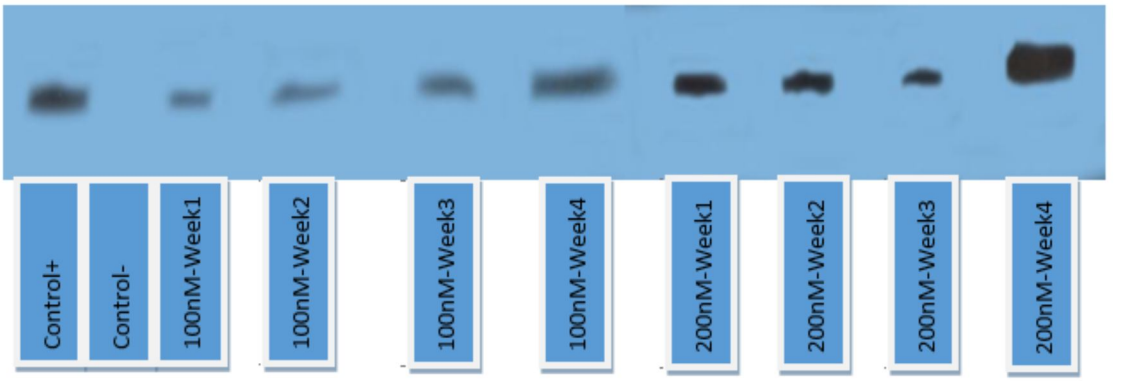
شکل (۱): سلول‌های گرانولوزای استخراج شده از فولیکول تخمدانی پس از گذشت یک روز از شروع کشت (A)، افزایش تعداد سلول‌ها پس از گذشت سه روز (B)، تراکم سلولی یک هفته پس از گذشت شروع کشت (C) بزرگنمایی X ۱۰۰.



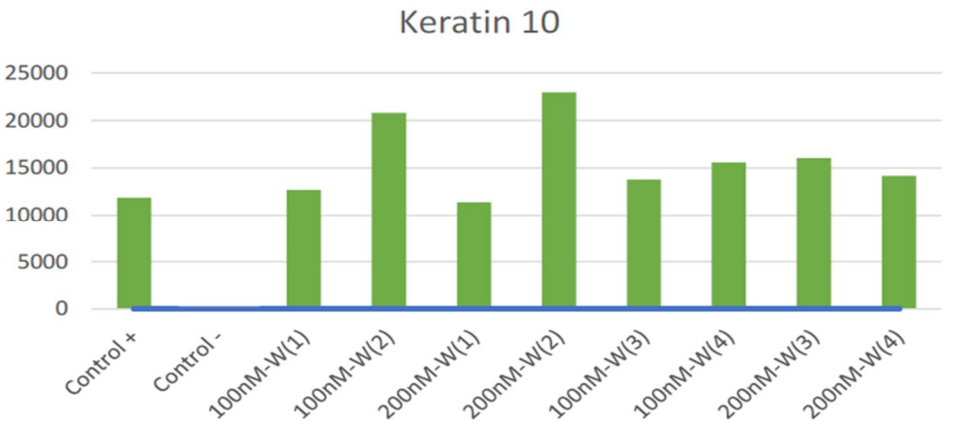
شکل (۲): القای سلول‌های گرانولوزا با دوز ۱۰۰ نانومولار القا کننده پس از گذشت یک هفته (A)، دوهفته (B)، سه هفته (C)، چهار هفته (D). القای سلول‌های گرانولوزا با دوز ۲۰۰ نانومولار القا کننده پس از گذشت یک هفته (E)، دوهفته (F)، سه هفته (G)، چهار هفته (H) بزرگنمایی X ۱۰۰. همانطور که در تصاویر دیده می‌شود هر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



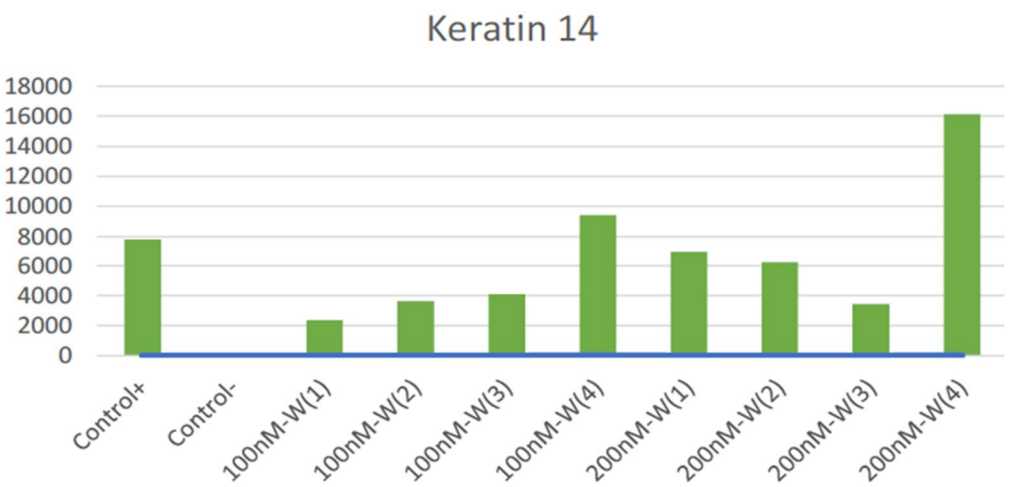
شکل (۳): بررسی بیان پروتئین کراتین ۱۰ در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک وسترن بلات



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



نمودار (۱): منحنی حاصل از نتیجه‌ی وسترن بلات پروتئین کراتین ۱۰ با استفاده از نرم افزار Image j 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.



نمودار (۲): منحنی حاصل از نتیجه‌ی وسترن بلات پروتئین کراتین ۱۴ با استفاده از نرم افزار Image j 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 ازجمله: آدیپوسیت، استخوان، غضروف و غیره را دارند و در زمینه‌های مختلف همچون علوم زیستی و پزشکی مانند ارتقا کیفیت درمانی مورداستفاده 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 ازجمله شکل‌های نشان‌دهنده‌ی 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 تائید می‌نمایند (۱۰، ۱۷). کل مدت‌زمان کشت در این پژوهش و مطالعه‌ی سلول‌های گرانولوزا در محیط آزمایشگاهی حدود ۱۷ روز طول کشید که بیانگر موفقیت در کشت طولانی‌مدت می‌باشد که مشابه نتیجه‌ی مطالعه‌ی Geyter و همکارانش می‌باشد (۱۰).

سلول‌ها پس از القا در مسیر کراتینوسایت عصاره‌گیری شده و تعین غلظت شدند و با استفاده از تکنیک وسترن بلات دو ژن کراتینوسایتی کراتین ۱۰ و کراتین ۱۴ موردبررسی و مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده از وسترن بلات و تجزیه‌وتحلیل 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 مطالعه‌ای دیگر Chavez و همکارانش توانستند سلول‌های بنیادی چربی گرفته شده از انسان را به سلول‌های شبه کراتینوسایتی تمایز دهند. در مطالعه‌ای که آن‌ها انجام دادند، بیان مارکرهای CD90 و CD105مثبت 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 هماتوپوئتیک 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 هماتوپوئتیک می‌باشد، اما معتقد بودند که سلول‌های هماتوپوئتیک به‌ندرت به سلول‌های کراتینوسایتی تمایز می‌یابند و منبع بیشتر سلول‌های کراتینوسایتی حاصل‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد (۲۲). پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که CTACK / CCL27 با تجمع سلول‌های دندریتیک مشتق از مغز استخوان سرعت‌ترمیم پوست را افزایش می‌دهد (۲۳).

درمجموع 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 قابل‌درمان با روش‌های کنونی نیستند، فراهم کرد. همچنین سلول‌های گرانولوزا توان تکثیر و تمایز به سایر رده‌های سلولی در محیط آزمایشگاهی را دارند، ازاین‌رو 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 رده‌ای 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, Treml 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.

Original Article

DIFFERENTIATION OF HUMAN OVARIAN FOLLICULAR GRANULOSA CELLS INTO KERATINOCYTES

*Masoud Maleki[1] *, Seyed Amin Ghoreishi[2], Mahrouz Dezfoulian[2], Arash Abdolmaleki[3,4]*

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

[1] Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran (Corresponding Author)
[2] Department of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
[3] Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran
[4] Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, Sabalan University of Advanced Technologies (SUAT), Namin, Iran