زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۵۴- ۴۳

مقاله پژوهشی

ارزیابی پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی تکای انسانی به سلول‌های شبه‌تخمک در تخمدان زنان با سنین تولیدمثلی مختلف

سیده نسیم میربهاری[۱]، اعظم دالمن[۱*]، فاطمه حسنی[۱]، مهدی توتونچی[۲]

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران

۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: azamdalman@yahoo.co.uk

DOI: 10.22034/ascij.2022.1963287.1402

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸

چکیده

شواهد حاکی از وجود و عملکرد سلول‌های بنیادی تخمدان (OSCs)، رو به افزایش است. در مطالعه‌ی پیشین این گروه، سلول‌های بنیادی تکای انسانی (hTSCs) از تخمدان یک بیمار ۱۹ ساله جدا و تحت شرایط القائی به سلول‌های شبه‌تخمک (hOLCs) تمایز داده شد. در این مطالعه، به‌منظور اثبات تکرارپذیری این آزمایش همچنین حضور این سلول‌ها در تخمدان افراد با سن تولیدمثلی بالاتر و پتانسیل تمایزی آن‌ها در آزمایشگاه، hTSCs از تخمدان بیماران بیست و ۳۸ ساله جداسازی و پتانسیل تمایزی آن‌ها به hOLCs در مقایسه با بیمار ۱۹ ساله ارزیابی شد. در این مطالعه‌ی مداخله‌ای تجربی، براساس دستورالعمل مطالعه‌ی پیشین، hTSCs از فولیکول‌های کوچک انترال اولیه با اندازه‌ی سه تا پنج میلی‌متر جدا شدند و پس از کشت و تکثیر، برای تمایز در ظروف شش چاهکه با تعداد ۵×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک در محیط القائی DMEM/F12 حاوی FBS، مایع فولیکول انسانی، گلوتامین و پیرووات به‌مدت چهل روز کشت داده شدند. سپس روند تکوین آنها در قالب ویژگی‌هایی مانند مورفولوژی، اندازه و زنده‌مانی سنجیده شد hTSCs با موفقیت از بافت تخمدان بیماران بیست و ۳۸ ساله جدا و در شرایط آزمایشگاهی، در محیط DMEM/F-12 حاوی فاکتورهای رشد (EGF، FGF، GDNF و غیره) کشت داده شدند. پس از ۱۲ روز، تمایز hTSCs به hOLCs در هر دو بیمار آغاز شد و مورفولوژی آنها از دوکی به گرد تغییر شکل داد. اندازه‌ی hOLCs در طول دوره‌ی تمایز در هر دو بیمار (از ۲۰-۲۵ میکرومتر به پنجاه میکرومتر) افزایش یافت. زنده‌مانی hOLCs نسبت به hTSCs در هر سه بیمار مشابه بود و تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند. بنابراین، نشان داده شد که hTSCs از تخمدان افراد با سنین تولیدمثلی مختلف، قابل جداسازی بوده و تفاوتی در الگوی تمایز آن‌ها به hOLCs در شرایط آزمایشگاهی وجود ندارد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی تکا، تمایز آزمایشگاهی، سلول‌های شبه سلول تخمک، تخمدان.

مقدمه

فرایند پیری تخمدان به معنای کاهش تدریجی کمیت و کیفیت فولیکول‌های تخمدانی است که در نهایت به یائسگی ختم می‌شود. پیری تخمدان تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله شیوه‌ی زندگی، عوامل

ژنتیکی، بیماری‌های خودایمنی و عوامل محیطی قرار دارد (۱۳). طی این فرایند، ترشح هورمون‌های استروژن و پروژسترون کاهش می‌یابد و آزادسازی تخمک با مشکل مواجه می‌شود (۲). در سال ۲۰۰۷، بوکوفسکی و همکاران مشاهده کردند که در مراحل ابتدایی تکوین جنین، سلول‌های بنیادی تخمدان، سلول‌های ایمنی، ماتریکس خارج سلولی و سیتوکین‌ها، کُنام سلول‌های بنیادی تخمدان را تشکیل می‌دهند (۳). در سال‌های اخیر نشان داده شده است که فرایند پیری تخمدان، به‌معنای پیر شدن این کُنام است. سلول‌های بنیادی تخمدان که جز اصلی این کنام هستند، از طریق عروق تخمدان، با سلول‌های ایمنی و سیستم گردش خون ارتباط برقرار می‌کنند؛ بنابراین، هرگونه تغییر در این دو سیستم، روی کنام سلول‌های بنیادی تخمدان تأثیر می‌گذارد (٤). عواملی مانند شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، برخی از بیماری‌ها مانند نارسایی زودرس تخمدان، رژیم غذایی نامناسب همچنین استعمال دخانیات می‌تواند عملکرد سیستم ایمنی و گردش خون را تحت تأثیر قرار دهد و به‌طور غیرمستقیم یک ریزمحیط مناسب برای پیری تخمدان‌ها فراهم کند (۲۲). با جداسازی سلول‌های بنیادی تخمدان از این کُنام می‌توان از توانایی باروری بالقوه‌ی این سلول‌ها بهره‌مند شد و آنها را به سلول‌های شبه‌جنسی تمایز داد. سلول‌های بنیادی تخمدان شامل سلول‌های بنیادی رده‌ی زایا و سلول‌های بنیادی سوماتیک تخمدان هستند (۱۹).

سلول‌های بنیادی سوماتیک تخمدان در بین سلول‌های اپی‌تلیوم سطحی، سلول‌های تکا و حتی به تعداد بسیار محدود در سلول‌های گرانولوزا وجود دارند (۷). در بین سلول‌های اپی‌تلیوم سطحی، تعدادی از سلول‌ها توانایی بازسازی خود همچنین تمایز به تخمک نابالغ در بدن و در آزمایشگاه را دارند.

زوتیک و همکاران در سال ۲۰۰۸ با افزودن H2B-GFP به اپی‌تلیوم تخمدان موش، این سلول‌ها را شناسایی و جمعیت سلولی در اپی‌تلیوم سطحی تخمدان موش را به‌عنوان منبعی برای سلول‌های بنیادی سوماتیک معرفی کردند (١٦). سلول‌های گرانولوزای تخمدان نیز منبع داخل تخمدانی دیگری برای برداشت سلول‌های بنیادی سوماتیک است که قابلیت تمایز به سه رده‌ی سلولی به‌صورت مجزا را دارند. کاوشکا و همکاران در مطالعه‌ای، سلول‌های گرانولوزا را از فولیکول بالغ استخراج کردند. سپس با افزودن فاکتورهای مهاری لوکمی (Leukemia Inhibitory Factor) LIF به این سلول‌ها متوجه تمایز آنها به رده‌های مختلف سلولی ازجمله سلول‌های عصبی، غضروفی و استخوانی شدند (۱۱). مطالعات سال‌های اخیر نشان داده‌اند که علاوه بر سلول‌های اپی‌تلیوم سطحی و سلول‌های گرانولوزا، سلول‌های تکا نیز حاوی سلول‌هایی با خواص شبه سلول‌های بنیادی مزانشیمی چندتوانی هستند که می‌توانند تحت شرایط خاص به سلول‌های دودمان خود، مانند سلول‌های تکا همچنین سلول‌های شبه‌تخمک تمایز یابند. اولین بار در سال ۲۰۰۷، هوندا و همکاران، سلول‌های بنیادی تکا TSCs (Theca Stem Cells) را با توانایی خودنوزایی و تمایز در بدن و در آزمایشگاه از تخمدان موش جداسازی کردند. آنها از نظر مورفولوژی شبیه به فیبروبلاست بودند و در شرایط آزمایشگاهی به‌صورت کلونی‌های گرد با جمعیت سلولی همگن تکثیر می‌شوند. TSCs پس از تیمار با سرم، هورمون لوتئینه کننده و فاکتورهای پاراکرین از سلول‌های گرانولوزا، به پیش‌سازهای اولیه و سلول‌های استروئیدوژنیک تمایز یافتند. در هر مرحله‌ی تمایز، این سلول‌ها بیان ژن مناسب و نشانگرهای مورفولوژیکی را نشان دادند. سپس آندروستندیون را ترشح کردند. هنگامی که TSCs به

تخمدان پیوند زده شدند، سلول های بنیادی فرضی به‌طور انحصاری در لایه‌ی تکای فولیکول‌ها به‌عنوان سلول‌های تمایز یافته قرار گرفتند (۱۰). حضور سلول‌های بنیادی چندتوان تکا در تخمدان خوک نیز در سال ۲۰۱۳ توسط لی و همکاران شناسایی شد. در این مطالعه TSCs جدا شده از فولیکول‌های تخمدانی توانستند علاوه بر تمایز به دودمان سلول‌های مزانشیمی، پس از القاء در محیط تمایزی اووژنز، مورفولوژی مشابه سلول تخمک را نشان دهند و ژن‌های اختصاصی تخمک را بیان کنند (۱۲). ادیب وهمکاران در سال ۲۰۱۷، همین نتایج را از TSCهای گوسفندی جداسازی شده به‌دست آورده و نشان دادند که این سلول‌ها، ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های بنیادی پرتوان را دارند. هویت این سلول‌ها با بیان ژن‌های خاص سلول تکا مانند *GLI2*،*PTCH1*، *GLI3* و *LHR* تأیید شد. این سلول‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی با بیان ژن‌های اختصاصی *DAZL*،*FRAGILIS*، *STELLA*، *PRDM1* ، *SYCP3* و *GDF9* به سلول‌های شبه‌تخمک تمایز پیدا کردند (۱). سلول‌های بنیادی تکا انسانی hTSCs (Human theca stem cells)توسط دالمن و همکاران در سال ۲۰۱۸ هویت‌یابی و ارزیابی شدند. در این مطالعه hTSCs از فولیکول‌های کوچک انترال (ابعاد سه تا پنج میلی‌متر) تخمدان سمت چپ بیمار جوانی (۱۹ ساله) جمع‌آوری شد که برای انجماد بافت تخمدان به پژوهشگاه رویان مراجعه کرده بود. فعالیت الکالین فسفاتازی، وضعیت چرخه‌ی سلولی و بیان شاخص‌های *CD29*، *CD73*، *CD90* و *CD105* به‌عنوان نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی در hTSCs اثبات شد. همچنین پتانسیل تمایزی hTSCs، با تمایز به سلول‌های شبه‌چربی، شبه‌استخوانی و شبه‌غضروفی اثبات شد. این مطالعه نشان داد که بیان *OCT4* در hTSCs بسیار بالاتر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان است (۶). تمایز hTSCs همان بیمار ۱۹ ساله به سلول‌های شبه‌تخمک انسانی نیز در سال ۲۰۱۹ انجام شد. در این مطالعه دالمن و همکاران، ظرفیت تمایز hTSC به سلول‌های شبه‌تخمک hOLCs (Human Oocyte Like Cells) را بررسی کردند. این گروه با تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از بیان برخی ژن‌ها و پروتیین‌های اختصاصی سلول زایا و تخمک، پتانسیل تمایز این سلول‌ها را ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که مورفولوژی hTSCs با قرار گرفتن در محیط تمایزی، به سلول‌های گرد تبدیل شد. علاوه بر این، برخی از ژن‌های مختص سلول‌های زایای اولیه، سلول‌های جنسی، ژن‌های ویژه‌ی تخمک و شاخص‌های خاص میوز، به‌طور قابل توجهی در hOLCs بیان شدند. در نتیجه، آنها نشان دادند که hTSCs توانایی تمایز به hOLCs را دارند (۵). در دو مطالعه‌ی اخیر، hTSCs تنها از یک بیمار جوان ۱۹ ساله جداسازی و بررسی شده بودند. از سوی دیگر بر اساس مطالعه‌ی یی و همکاران در سال ۲۰۱۷، در فرایند پیری تخمدان، عامل اصلی کاهش عملکرد تولیدمثلی، پیر شدن و تخریب آشیانه‌های سلول‌های بنیادی تخمدان است تا پیری خود سلول‌های زایای تخمدان (۲۲). بنابراین، در این مطالعه، علاوه بر اثبات تکرارپذیری، به ارزیابی جداسازی و پتانسیل تمایزی hTSCs به hOLCs در تخمدان بیمار بیست ساله همچنین ۳۸ ساله‌ای پرداخته شد که در انتهای سن تولیدمثلی قرار داشت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی مداخله‌ای تجربی، مجوز کمیته‌ی اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی از پژوهشگاه رویان و بر طبق اعلامیه‌ی هلسینکی با شناسه‌ی اخلاق (IR.ACECR.ROYAN.REC.1400.030) دریافت شد (۲۱).

جداسازی و کشت hTSCs: در این مطالعه، برای جداسازی hTSCs از تخمدان افراد تراجنسیتی HCV^-، HBS^-، HIV^- و $Covid\text{-}19^-$ بیست و ۳۸ ساله (به‌ترتیب اوایل و اواخر سن تولیدمثلی) مراجعه کننده به بیمارستان آرش استفاده شد که شش ماه پیش از انجام عمل جراحی تغییر جنسیت، فرایند هورمون‌درمانی در آنها قطع شده بود. این افراد مبتلا به هرمافرودیسم کاذب مردانه (کاریوتیپ XY ٤٦) با دستگاه تناسلی زنانه و مبتلا به ابهام جنسیتی بودند. تخمدان این افراد خارج و در محلول PBS سرد به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس فولیکول‌های آنترال کوچک به اندازه‌ی سه تا پنج میلی‌متر از دو تخمدان به‌کمک تیغ جراحی زیر میکروسکوپ جدا شدند. فولیکول‌ها در محیط DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ده درصد آلبومین جنین گاوی (FBS, Gibco) برش داده شدند. تخمک‌ها و سلول‌های گرانولوزا با خراش ملایم توسط اسپچولا خارج شدند. سلول‌های باقی‌مانده که شامل لایه‌ی تکای واقع در دیواره فولیکول بودند، به قطعات کوچک تقسیم شدند و با ۰/۵ درصد کلاژناز نوع (Sigma, St. Louis, MO) به مدت ٤٥ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در این فاصله برای تسریع در هضم آنزیمی نمونه‌ها هر ده دقیقه یکبار از حمام آب گرم خارج شده تکان داده شده و سپس دوباره در حمام ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ٤٥ دقیقه فعالیت آنزیم با افزودن محیط حاوی ۱۰ درصد FBS خنثی شد. سوسپانسیون سلولی از فیلترهای صد و چهل میکرومتری (BD Falcon، مکزیک) عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ، سلول‌ها در محیط DMEM/F12 حاوی ده درصد FBS، دو میلی‌مولار گلوتامین، صد واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین G، صد میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، بیست نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه‌ای (rhbFGF-2)، ده نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (rhEGF)، ده نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور نوروتروپیک مشتق از گلیال (GDNF) در انکوباتور دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد با پنج درصد Co_2 انکوبه شدند. به محض اینکه سلول‌ها به تراکم هفتاد تا هشتاد درصد رسیدند، با کمک ۰/۲۵ درصد تریپسین – اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (تریپسین–EDTA، Gibco) تریپسینه شدند و به‌مدت پنج دقیقه با دور ۱۲۰۰ دور موتور در دقیقه سانتریفیوژ و کشت داده شدند. در نهایت، در پاساژ سوم، سلول‌های چسبیده، طبق مطالعات پیشین ما، hTSCs در نظر گرفته شده و برای ارزیابی‌های بیشتر استفاده شدند. hTSCs بیمار ۱۹ ساله از بانک سلول پژوهشگاه رویان گرفته شد که در مطالعه‌ی پیش از تخمدان چپ بیمار مبتلا به سرطان که بر خلاف تخمدان راست از لحاظ پاتولوژی کاملا سالم بود، جداسازی شد.

تهیه‌ی مایع فولیکولی انسانی: مایع فولیکولی زنان ۱۹ تا ۳۸ ساله مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان، با فاکتور ناباروری مردانه با دور دو هزار دور موتور در دقیقه به‌مدت ده دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی که همان مایع فولیکولی است، برای استفاده به‌مدت سی دقیقه در دمای ٥٦ درجه‌ی سانتی‌گراد غیرفعال و در مقادیر کم در فریزر ۲۰- نگهداری شدند

تمایز hTSCs به hOLCs: طبق روش دایس و همکاران، hTSCs به تعداد پنجاه هزار سلول در محیط کشت DMEM-F12 همراه با پنج درصد FBS، پنج درصد مایع فولیکولی و دو میلی‌مولار گلوتامین به‌مدت چهل روز در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و پنج درصد CO_2 کشت شدند (۸). محیط کشت سلول‌ها دو بار در هفته تعویض شد.

ارزیابی اندازه و مورفولوژی hOLCs: تغییرات مورفولوژیکی و اندازه‌ی hOLCs در روزهای مختلف

تمایز بررسی و با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین دیجیتال (Moticam pro 280; Motic Instruments Inc., Xiamen, China) و با استفاده از نرم‌افزار (version 6 UTHSCSA, San Antonio, Texas, USA) ارزیابی شد.

ارزیابی زنده‌مانی hTSCs و hOLCs: زنده‌مانی سلول‌ها (Viability) با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ارزیابی شد. سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیرند؛ حال آنکه سلول‌های مرده، رنگ را جذب می‌کنند. برای رنگ‌آمیزی hTSCs، تریپان بلو ۰/۴ درصد با همان حجم از سوسپانسیون سلولی در یک ویال ۰/۲ به‌آرامی پیپتاژ شد. ده میکرولیتر از مخلوط روی لام نئوبار قرار داده شده و زیر میکروسکوپ معکوس شمارش شد. برای رنگ‌آمیزی hOLCs، این سلول‌ها در قطره تریپان‌بلو ۰/۴ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با PBS شسته شده و زیر میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد.

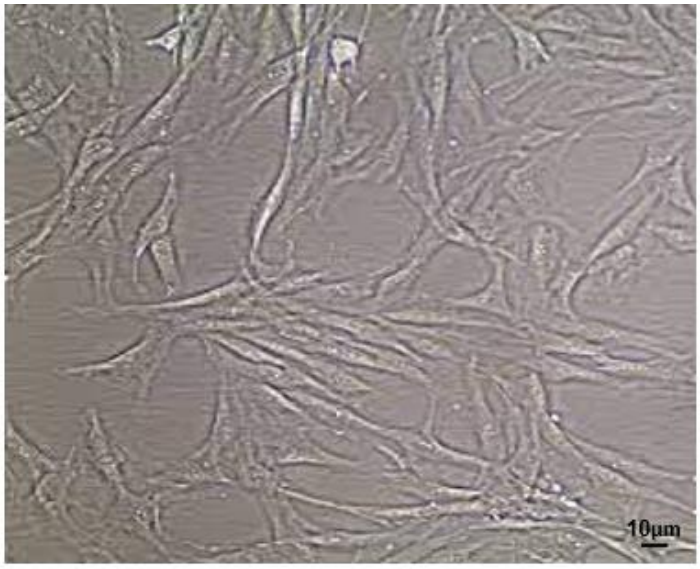
تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ انجام شد. متغیرهای پیوسته به‌صورت میانگین ± انحراف معیار و متغیرهای طبقه‌بندی شده به‌صورت عدد (درصد) بیان شدند. طبیعی بودن متغیرهای مورد مطالعه با آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

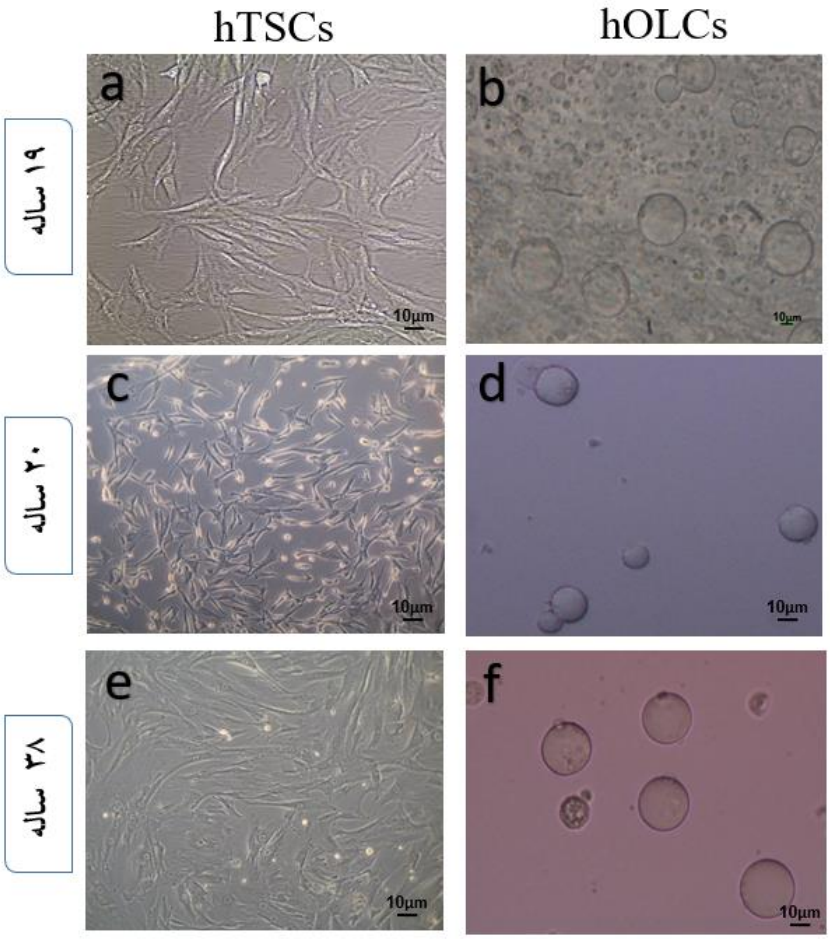
ارزیابی مورفولوژی hTSCs: مورفولوژی hTSCs در کشت مشابه hTSCs جدا شده از تخمدان بیمار ۱۹ ساله، فیبروبلاستی و دوکی‌شکل بوده و قابلیت چسبندگی به کف ظرف کشت همچنین تمایز به hOLCs را پس از قرار گرفتن در محیط القائی داشتند (شکل ۱).

ارزیابی مورفولوژی و اندازه hOLCs: hTSCs جدا شده به‌مدت چهل روز در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند زیرا سلول‌ها در روزهای مختلف، تمایز پیدا می‌کردند. شروع تمایز hTSCs در هر دو بیمار بیست و ۳۸ ساله برخلاف بیمار ۱۹ ساله، حدود روز دوازدهم کشت بود که مورفولوژی سلول‌ها از دوکی به گرد تغییر یافت. مورفولوژی hTSCs جدا شده از بیمار ۱۹ ساله، حدود ۲۵ روز پس از القاء تمایز تغییر کرد (۹). مورفولوژی سلول‌های گرد شبیه به تخمک بود. این سلول‌ها بر خلاف hTSCs چسبنده نبوده و در محیط کشت معلق بودند (شکل ۲). به‌دنبال تمایز، اندازه و تعداد این سلول‌ها در طول زمان افزایش یافت (از قطر اولیه بیست تا ۲۵ میکرومتر به پنجاه میکرومتر در روز چهل تمایزی رسید). (شکل ۳).

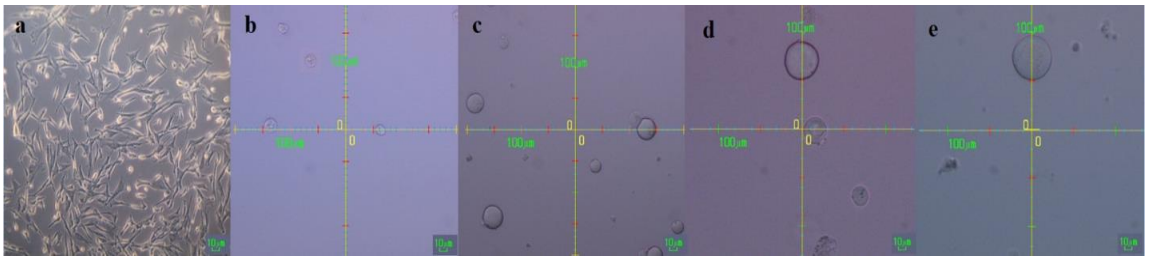
ارزیابی زنده‌مانی hTSCs وhOLCs: زنده‌مانی hTSCs بیمار ۱۹، ۲۰ و ۳۸ ساله دو روز پس از کشت، زمانی که سلول‌ها در فاز رشد بودند، توسط تریپان‌بلو ارزیابی شد. زنده‌مانی این سلول‌ها به‌ترتیب ۸۶/۴۸، ۸۲/۰۵ و ۸۶/۳۶ درصد بود. نرخ زنده‌مانی hTSCs در بین سه بیمار تفاوت معناداری نداشت (P>0.05). زنده‌مانی hOLCs بیمار ۱۹، ۲۰ و ۳۸ ساله به‌ترتیب ۷۲/۷۲، ۷۰/۵۸ و۷۶/۶۶ درصد بود که تفاوت معناداری بین آنها مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$) (شکل ٤).



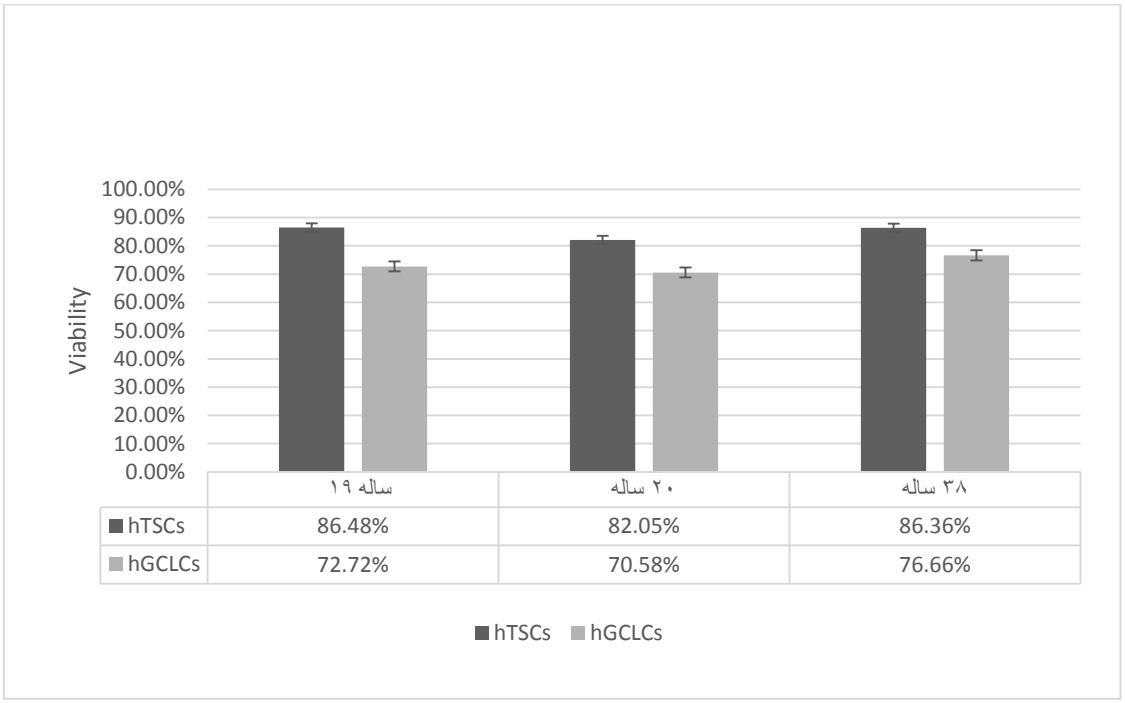
شکل ۱- نمای میکروسکوپ نوری از ویژگی‌های ظاهری hTSCs که حالت دوکی شکل را نشان می‌دهند.



شکل ۲- ارزیابی مورفولوژیکی hTSCs و hOLCs در سه بیمار ۱۹، ۲۰ و ۳۸ ساله. a، c و e hTSCs جدا شده از به‌ترتیب تخمدان سه بیمار ۱۹، ۲۰و ۳۸ ساله پیش از تمایز. b، d. و f hOLCs بیمار ۱۹، ۲۰ و ۳۸ ساله به‌ترتیب پس از گذشت چهل روز از تمایز که به‌اندازه‌ی تقریبی پنجاه میکرومتر رسیدند. مقیاس ده میکرومتر.



شکل ۳- تغییر مورفولوژی و اندازه‌ی hOLCs پس از تمایز آزمایشگاهی hTSCs در محیط کشت اختصاصی. a. hTSCs. b. hOLCs به‌ترتیب ۱۲، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تمایز. مقیاس: ده میکرومتر.



	ساله ۱۹	۲۰ ساله	۳۸ ساله
hTSCs	86.48%	82.05%	86.36%
hGCLCs	72.72%	70.58%	76.66%

شکل ٤- زنده‌مانی hTSCs و hOLCs در سه بیمار ۱۹، ۲۰ و ۳۸ ساله. تفاوت معناداری بین گروه‌ها مشاهده نشد.

بحث

در مطالعه‌ی پیشین، hTSCs بیمار ۱۹ ساله جداسازی و در محیط تمایزی حاوی پنج درصد مایع فولیکولی انسانی، به hOLCs تمایز داده شد. در مطالعه‌ی حاضر ما بر آن شدیم که hTSCs را از دو بیمار دیگر در سنین مختلف جداسازی کنیم تا نشان دهیم آیا نتایج مطالعه‌ی پیش، قابلیت تکرارپذیری دارد یا در سنین بالای تولیدمثلی، نیز می‌توان hTSCs را به hOLCs تمایز داد؛ بنابراین، hTSCs از تخمدان دو بیمار بیست و ۳۸ ساله جداسازی و پس از سه پاساژ، در محیط تمایزی کشت داده شد تا از نظر مورفولوژی، اندازه و زنده‌مانی ارزیابی شد و با نتایج این سلول‌ها در بیمار ۱۹ ساله مقایسه شود.

تعدادی از hTSCs در هر دو بیمار بیست و ۳۸ ساله، حدود ۱۲ روز پس از قرار گرفتن در محیط تمایزی، به سلول‌هایی با مورفولوژی گرد تمایز یافتند. مورفولوژی این سلول‌ها در هر سه بیمار، مشابه یکدیگر همچنین مشابه hOLCs حاصل از تمایز hTSCs بیمار ۱۹ ساله بود. در روزهای بعدی نیز سلول‌های بیشتری به سلول‌هایی با مورفولوژی گرد تغییر شکل دادند. بنابراین، این سلول‌ها به‌مدت چهل

روز در محیط تمایزی نگهداری شدند تا از تمایز سلول‌ها در روزهای مختلف حمایت شود. در مطالعه‌ی پیشین، محیط تمایزی hTSCs بیمار ۱۹ ساله پس از ۱۶ الی ۱۸ روز، از رنگ ارغوانی به رنگ زرد تغییر می‌یافت و گرد شدن سلول‌ها ۲۵ روز پس از قرار گرفتن در محیط تمایزی آغاز می‌شد. در این مقاله ذکر شده است که دلیل این تغییر رنگ می‌تواند ناشی از تغییرات متابولیسمی محیط و آغاز تمایز باشد (۵). در مطالعه حاضر تغییر رنگ محیط کشت تمایزی محسوس نبود. در مطالعه‌ی حاضر، تغییر رنگ محیط کشت تمایزی محسوس نبود. در مطالعه‌ی دیگری، توسط دایس و همکاران، سلول‌های بنیادی پوست جنین خوک به سمت سلول‌های شبه تخمکی تمایز داده شد. در این مطالعه، حدود روز بیستم کشت در شرایط آزمایشگاهی، سلول‌های بنیادی، آغاز به تمایز به ساختارهای کلونی مانند کردند و حدود روز سی‌ام، این ساختارهای کلونی‌مانند از کف ظرف جدا شده و تجمعات معلق سلولی ایجاد کردند (۸).

همچنین ویرانت و همکاران، سلول‌های بنیادی اپی‌تلیال سطحی تخمدان را در محیط تمایزی کشت دادند و بین روزهای پنج تا ۳۱ سلول‌های گرد شبه‌تخمکی را مشاهده کردند (۱۸). یو و همکاران سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی را استخراج کرده و در روز پنجم انکوباسیون با محیط تمایزی، مشاهده کردند که مورفولوژی برخی از این سلول‌ها از فیبروبلاستی به گرد تغییر شکل داده‌اند (۲۳). بنابراین، به‌نظر می‌رسد که زمان تمایز سلول‌های بنیادی به سلول شبه‌تخمک بسته به نوع سلول اولیه به‌کار رفته برای تمایز متفاوت است و این زمان ارتباطی با سن بیمار ندارد.

در مطالعه‌ی حاضر، hOLCs ظاهری گرد شبیه به تخمک داشتند و میانگین قطر این سلول‌ها هنگام تمایز، بیست تا ۲۵ میکرومتر بود که مشابه سایز اووگونی است. قطر hOLCs در هر سه بیمار هر هفته ارزیابی شد و در پایان هفته‌ی هشتم به پنجاه میکرومتر رسید که این اندازه با اندازه‌ی تخمک فولیکول پریموردیال قابل مقایسه است. تعداد سلول‌های گرد نیز در هر هفته افزایش پیدا کرد. در مطالعه‌ی پیشین، قطر hOLCs بیمار ۱۹ ساله نیز در اولین روز تمایز مشابه بیمار بیست و ۳۸ ساله بود. در این مطالعه پیشنهاد شد که برای افزایش تکوین hOLCs، آنها با سلول‌های گرانولوزای انسانی هم‌کشتی شوند. پس از ۷-۱۰ روز هم‌کشتی با سلول‌های گرانولوزا، قطر برخی از این سلول‌ها، تا اندازه‌ی ۶۰ -۷۰ میکرومتر افزایش یافت (۵). در این مطالعه پیشنهاد شد که برای افزایش تکوین hOLCs، آنها با سلول‌های گرانولوزای انسانی هم‌کشتی شوند. پس از ۷-۱۰ روز هم‌کشتی با سلول‌های گرانولوزا، قطر برخی از این سلول‌ها، تا اندازه‌ی ۶۰ -۷۰ میکرومتر افزایش یافت (۱).

در مطالعه‌ی دایس و همکاران، سلول‌های بنیادی مشتق شده از پوست موش‌های تازه متولد شده در محیط تمایزی قرار گرفتند. در روز دوازدهم تمایز، اندازه‌ی این سلول‌ها به اندازه‌ی تقریبی چهل میکرومتر رسید. برای افزایش اندازه و تکوین OLCs، این سلول‌ها با سلول‌های حاصل از هضم انزیمی تخمدان موش تازه متولد شده، هم‌کشتی و به کپسول کلیه‌ی موش پیوند زده شدند. پس از ۱۶ هفته پیوند، قطر OLCs به اندازه‌ی تقریبی صد میکرومتر رسید (۸). در مطالعه وایت و همکاران نیز سلول‌های بنیادی تخمدان، در محیط تمایزی به سلول‌هایی با مورفولوژی گرد و قطری به اندازه‌ی ۳۵-۵۰ میکرومتر تمایز یافتند (۲۰). بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، الگوی رشد hOLCs در هر سه بیمار مشابه بود. زنده‌مانی hTSCs بیمار ۱۹، ۲۰ و ۳۸ ساله دو روز پس از کشت، زمانی که سلول‌ها در فاز رشد قرار

داشتند، توسط تریپان بلو ارزیابی شد. زنده‌مانی این سلول‌ها در هر سه بیمار مشابه و به‌ترتیب ۴۸/۸۶، ۸۲/۰۵ و ۸۶/۳۶ درصد بود که نشان می‌دهد شرایط انکوباسیون برای سلول‌ها مناسب بوده است. در سال ۲۰۱۷، گان و همکاران به‌دنبال معرفی یک روش بهینه برای کشت سلول‌های تکا، این سلول‌ها را از فولیکول (F2-F4) اردک دو ساله جدا کردند و در محیط DMEM/F12 حاوی ده درصد FBS، صد واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین G و صد واحد بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت دادند. زنده‌مانی این سلول‌ها به روش MTT تا هفت روز ارزیابی و در دومین روز کشت بیشترین میزان زنده‌مانی مشاهده شد (۹). زنده‌مانی hOLCs در هر سه بیمار ۱۹، ۲۰ و ۳۸ ساله به‌ترتیب ۷۲/۷۲، ۷۰/۵۸ و۷۶/۶۶ بود که تفاوت معناداری بین آنها مشاهده نشد. داده‌ها نشان دادند که سن، عامل تأثیرگذاری بر نرخ زنده‌مانی سلول‌های حاصل از تمایز نیست و hOLCs بیمار ۳۸ ساله نیز پس از هشت هفته کشت، نرخ زنده‌مانی مشابه با hOLCs حاصل از بیمار ۱۹ و بیست ساله داشتند.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که hTSCs جدا شده از تخمدان بیمار ۳۸ ساله مانند این سلول‌ها در بیمار ۱۹ و بیست ساله به hOLCs تمایز پیدا کرده و روند افزایش اندازه و نرخ زنده‌مانی مشابهی را نشان دادند. نرخ تمایز hTSCs به سلول‌های گرد در بیمار ۳۸ ساله از این فرضیه حمایت می‌کند که از کار افتادن تخمدان در سنین بالا، نتیجه‌ی پیری سلول‌های بنیادی نیست، بلکه به‌دلیل پیری کُنام سلول‌های بنیادی مرتبط است. منظور از کُنام سلول‌های بنیادی تخمدان، مجموعه‌ای از سلول‌های بنیادی موجود در تخمدان، تعامل این سلول‌ها با یکدیگر، ماتریکس خارج سلولی و سیتوکین‌های ترشح شده است (۱۳). در افراد مسن، با وجود سلول‌های بنیادی سالم، خراب شدن کُنام سلول‌های بنیادی، درنهایت منجر به عدم تعادل سیستم‌های بدن می‌شود. در نتیجه با وجود فعالیت سلول‌های بنیادی زایای تخمدان، عملکرد تخمدان کاهش می‌یابد (۱۷). در مطالعه‌ی نیکورا و همکاران در سال ۲۰۰۹، سلول‌های زایای تخمدانی، از موش‌های ماده با سن تولیدمثلی بالا (بیست ماهه) جداسازی و به تخمدان موش جوان (دو ماهه) پیوند زده شد. شش هفته پس از پیوند، بیان شاخص‌های مختص میوز شامل Stra8 و DAZl در سلول‌های زایای پیوند زده شده افزایش یافت. مطالعه‌ی آن‌ها نشان داد که سلول‌های زایای موش پیر، می‌تواند با قرار گرفتن در معرض فاکتورهای محیطی مناسب، قدرت باروری خود را دوباره به‌دست آورد (۱۵). در مطالعه‌ی دیگر در سال ۲۰۱۰، بافت تخمدان موش‌های جوان به موش مسن پیوند زده شد. در این مطالعه، تعداد فولیکول‌های نابالغ در بافت پیوندی موش‌های جوان کاهش یافت (۱۴). مطالعه‌ی حاضر، به بررسی ویژگی‌های مورفولوژی، اندازه و زنده‌مانی نمونه‌ی انسانی پرداخته است؛ بنابراین، با محدودیت‌هایی در رابطه با جمع‌آوری تعداد نمونه‌ی بیشتر به‌دلیل وجود مسائل اخلاقی مواجه بود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که مطالعه‌ی انجام شده در گذشته، تکرارپذیر بوده و برای دو بیمار بیست و ۳۸ ساله، نتایج تمایز، زنده‌مانی و تغییر مورفولوژی تأییدکننده‌ی نتایج پیشین بود. سن ۳۸ سالگی، اواخر سن تولیدمثلی محسوب می‌شود و در این سن برخی افراد با مشکلات باروری موجه‌اند. تمایز سلول‌های بنیادی تکا به سلول شبه‌تخمک، افزایش اندازه و کیفیت مورفولوژی این سلول‌ها، اُمیدی برای ادامه‌ی مسیر تمایز و استفاده از سلول‌های بنیادی افراد با سن بالا برای تولید سلول‌های

شبه‌تخمک است؛ هرچند برای تأیید ویژگی‌های تخمک، نیاز به مطالعات بیشتر در شرایط برون‌تنی (in vitro) و درون‌تنی (in vivo) است.

منابع

1. Adib S., Valojerdi M.R. 2017. Molecular assessment, characterization, and differentiation of theca stem cells imply the presence of mesenchymal and pluripotent stem cells in sheep ovarian theca layer. *Research in Veterinary Science*, 114:378-387.

2. Broekmans F.J., Soules M.R., Fauser B.C. 2009. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocrine Reviews*, 30(5):465-493.

3. Bukovsky A. 2011. Ovarian stem cell niche and follicular renewal in mammals. *Anatomical Record (Hoboken)*, 294(8):284-306.

4. Da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(9):287-299.

5. Dalman A., Totonchi M., Rezazadeh Valojerdi M. 2019. Human ovarian theca-derived multipotent stem cells have the potential to differentiate into oocyte-like cells in vitro. *Cell Journal*, 20(4):527-536.

6. Dalman A., Totonchi M., Valojerdi M.R. 2018. Establishment and characterization of human theca stem cells and their differentiation into theca progenitor cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12):853-865.

7. Dunlop C.E., Telfer E.E., Anderson R.A. 2014. Ovarian germline stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(4):98.

8. Dyce P.W., Liu J., Tayade C., Kidder G.M., Betts D.H., Li J. 2011. In vitro and in vivo germ line potential of stem cells derived from newborn mouse skin. *PloS One*, 6(5):e203-239.

9. Gan X., Chen D., Deng Y., Yuan J., Kang B., Qiu J., Sun W., Han C., Hu J., Li L., Wang J. 2017. Establishment of an in vitro culture model of theca cells from hierarchical follicles in ducks. *Bioscience Reports*, 37(3).

10. Honda A., Hirose M., Hara K., Matoba S., Inoue K., Miki H., Hiura H., Kanatsu-Shinohara M., Kanai Y., Kono T., Shinohara T., Ogura A. 2007. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30):12389-12394.

11. Kossowska-Tomaszczuk K., De Geyter C., De Geyter M., Martin I., Holzgreve W., Scherberich A., Zhang H. 2009. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(1):210-219.

12. Lee Y.M., Kumar B.M., Lee J.H., Lee W.J., Kim T.H., Lee S.L., Ock S.A., Jeon B.G., Park B.W., Rho G.J. 2013. Characterization and differentiation of porcine ovarian theca-derived multipotent stem cells. *Veterinary Journal (London, England*, 197(3):761-768.

13. Lin H. 2002. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nature Reviews Genetics*, 3(12):931-940.

14. Massasa E., Costa X.S., Taylor H.S. 2010. Failure of the stem cell niche rather than loss of oocyte stem cells in the aging ovary. *Aging*, 2(1):1-2.

15. Niikura Y., Niikura T., Tilly J.L. 2009. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging*, 1(12):971-978.

16. Szotek P.P., Chang H.L., Brennand K., Fujino A., Pieretti-Vanmarcke R., Lo Celso C., Dombkowski D., Preffer F., Cohen K.S., Teixeira J., Donahoe P.K.. 2008. Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell

characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34):12469-12473.

17. Turola E., Petta S., Vanni E., Milosa F., Valenti L., Critelli R., Miele L., Maccio L., Calvaruso V., Fracanzani A.L., Bianchini M., Raos N., Bugianesi E., Mercorella S., Di Giovanni M., Craxì A., Fargion S., Grieco A., Cammà C., Cotelli F., Villa E. 2015. Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Disease Models & Mechanisms*, 8(9):1037-1046.

18. Virant Klun I. 2018. Functional testing of primitive oocyte-like cells developed in ovarian surface epithelium cell culture from small VSEL-like stem cells: Can they be fertilized one day? *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(5):715-721.

19.Virant-Klun I., Stimpfel M., Skutella T. 2012. Stem cells in adult human ovaries: from female fertility to ovarian cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 18(3):283-292.

20. White Y.A., Woods D.C., Takai Y., Ishihara O., Seki H., Tilly J.L. 2012. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature Medicine*, 18(3):413-421.

21. Word Medical Association, 2013. Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*.310(20):2191-2194.

22. Ye H., Zheng T., Li W., Li X., Fu X., Huang Y., Hu C., Li J., Huang J., Liu Z., Zheng L., Zheng Y. 2017. Ovarian stem cell nests in reproduction and ovarian aging. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 43(5):1917-1925.

23. Yu X., Wang N., Qiang R., Wan Q., Qin M., Chen S., Wang H. 2014. Human amniotic fluid stem cells possess the potential to differentiate into primordial follicle oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, 90(4):73.

Evaluation of the Differentiation Potential of Human Theca Stem Cells to Oocyte-Like Cells in the Ovary of Women of Different Reproductive Ages

Seyedeh Nasim Mirbahari[1], Azam Dalman[1*], Fatemeh Hassani[1], Mehdi Totonchi[2]

1-Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
2-Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

Abstract

The evidence about the existence and function of ovarian stem cells (OSCs) is increasing. In a previous study, we isolated human theca stem cells (hTSCs) from the ovary of a 19-year-old patient and differentiated them into oocyte-like cells (hOLCs) under induced conditions. In this study, in order to prove the repeatability of this experiment as well as the presence of these cells in the ovaries of patients with higher reproductive age and their differentiation potential in-vitro, hTSCs were isolated from the ovaries of 20 and 38-year-old patients and their differentiation potential into hOLCs has been evaluated. In this experimental interventional study, based on the instructions of the previous study, hTSCs were isolated from small antral follicles with a size of 3 to 5 mm. These cells were cultured in six-well plates with A number of 5×10^4 cells per well in DMEM/F12 induction medium containing FBS, human follicular fluid, glutamine and pyruvate for 40 days. Then their development process was measured by assessing the morphology, size and viability. hTSCs were successfully isolated from ovarian tissue of 20 and 38-year-old patients and cultured in DMEM/F-12 medium containing growth factors (EGF, FGF, GDNF, etc.). After 12 days, hTSCs in both patients started to differentiate into hOLCs and their morphology changed from spindle-shaped to round. The size of hOLCs increased during the differentiation period in both patients (from 20-25 µm to 50 µm). The survival of hOLCs compared to hTSCs was similar in all three patients and did not differ significantly. hTSCs can be isolated from ovaries of women of different reproductive ages and there is no difference in their differentiation pattern to hOLCs in laboratory (in-vitro) conditions.

Keyword: Theca stem cells, In-vitro differentiation, Oocyte-like cells, Ovary.