

## Research Paper

# Morphology and Molecular Studies and Differentiation Ability of Ovarian Stem Cells in Newborn Syrian Rats



\*Samane Adib<sup>1</sup> 

1. Department of Anatomical Sciences and Cognitive Neuroscience, Faculty of Medicine, Branch of Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.



**Citation** Adib S. [Morphology and Molecular Studies and Differentiation Ability of Ovarian Stem Cells in Newborn Syrian Rats (Peasian)]. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2022; 16(9):756-767. <https://doi.org/10.32598/qums.16.9.2715.1>

 <https://doi.org/10.32598/qums.16.9.2715.1>



Received: 28 Aug 2022

Accepted: 16 Oct 2022

Available Online: 01 Dec 2022

### Keywords:

Ovarian stem cells,  
Oocytes, Theca cells,  
Granulosa cells, Ovarian follicle

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** The ability of ovarian stem cells (OSCs) to differentiate into oocyte-like and theca cells may lead to major advances in infertility treatment. However, little is known about the function, growth and differentiation potentials of these cells. In this study, we aim to examine the characteristics of OSCs obtained from newborn rats and assess their ability to differentiate into osteocyte-like and adipocyte-like cells.

**Methods:** In this study, OSCs were isolated from newborn Syrian rats and were then cultured. After the third passage, using the PCR method, the expression of stem cell markers (Sox2, Pou5f, and Nanog) was examined. Their potential to differentiate into osteocyte-like and adipocyte-like cells was examined by Alizarin red and Oil red staining, respectively.

**Results:** The isolated OSCs were adherent and morphologically similar to fibroblast cells, and had the power to multiply. They expressed stem cells markers. In addition, they were able to differentiate into adipocyte-like and osteocyte-like cells 21 days after being placed in the differentiation medium. In the osteocyte-like cells, fat droplets were observed after oil red staining.

**Conclusion:** The OSCs include multipotent stem cells that are able to express markers related to stem cells and can differentiate into osteocyte-like and adipocyte-like cells.

### \* Corresponding Author:

Samane Adib, PhD.

**Address:** Department of Anatomical Sciences and Cognitive Neuroscience, Faculty of Medicine, Branch of Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**Tel:** +98 (21) 44807776

**E-Mail:** s.adib@iautmu.ac.ir

## Extended Abstract

### Introduction

**T**he ovary is an endocrine organ that need granulosa and theca cells for secretions. In the ovary tissue, in addition to follicles, there are stem cells. These stem cells can be located in the cortex, epithelium, and the area between the cortex and medulla of the ovary. For many years, researchers believed that the number of primordial follicles in the ovary is constant after birth. However, new studies have shown that ovarian stem cells (OSCs) have the ability to differentiate into oocyte-like cells. In addition, OSCs are able to differentiate into theca cells. There are stem cells located in different tissues of the body after birth. These cells are multipotent type and are called mesenchymal stem cells. These cells can be extracted from a variety of tissues such as bone marrow and adipose tissue. Mesenchymal stem cells also express some markers of stem cells, such as Sox2, Pou5f, and Nanog. These fibroblast-like cells are non-hematopoietic and undifferentiated with adhesive property. They can proliferate extensively and can differentiate into several types of mesodermal and non-mesodermal cells, such as bone cells and adipocytes. In this study, we aim to investigate the characteristics of OSCs in rats in terms of the expression of some stem cell markers and their ability to differentiate into osteocyte-like and adipocyte-like in vitro.

### Methods

First, five newborn Syrian rats (DBA2) were euthanized by cervical dislocation method. Then, their ovaries (n=10) were removed and transferred to the culture dish under the loop. After slicing the ovarian tissue, their remnants were placed in collagenase and incubated for 15 minutes. Then, it was neutralized with serum, and the contents were passed through a 70-mesh filter. Afterwards, the cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS). The sediment of the cells was transferred into a 25-cm flask under the cell culture hood and cultured in DMEM/F12 culture medium containing 10% FBS. Then, they were kept in the incubator. After 24h, the medium was changed. After 3-4 days, the cells filled the bottom of the flasks due to multiplication. At this time, the first passaging was done for cell cultivation. In this method, the cells were separated from the bottom of the flask using the trypsin/EDTA solution. The cells were separated from each other by pipetting, and then were centrifuged. After centrifugation, the media of the Falcon tube were drained. Afterward, some culture medium was added to the tube, and pipetting was performed again. The contents of the

falcon tube were again poured into three culture flasks and placed inside the incubator at 37°C. After 3 passages, completely uniform cells with a completely similar appearance remained in the bottom of the flask, which was ready for examination. A part of the cells was used for molecular study, and the other part was used for the differentiation process. For the molecular study, after RNA extraction and cDNA synthesis, the expression level of genes related to OSCs, including Sox2, Oct4, and Nanog, was measured by the real-time PCR method. Beta-tubulin gene was used as the reference gene. Amplified fragments from each sample were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. After the third passage, some of the stem cells were centrifuged and then cultured in the prepared stem cell culture differentiation media specifically for bone and fat cells for 21 days. The differentiation potential of these cells into osteocyte-like and adipocyte-like cells was investigated by Alizarin red and Oil red staining, respectively after 21 days.

### Results

When the stem cells were placed on the plate, they were round and did not adhere to the bottom of the plate. After 8 hours, these cells were gradually adhered to the bottom of the plate, and 24 hours later, they started to form colonies in the initial stage of culture. These colonies consisted of flattened, spindle-shape, round, and long cells. After the third passage, these cells became uniform; almost all of them were adhered to the bottom of the plate and were spindle-shaped and elongated. These cells had an appearance similar to fibroblastic cells. Genes related to transcription factors Sox2, Oct4, and Nanog were expressed in these stem cells extracted from the ovary using the PCR method. Following the differentiation of theca stem cells into adipocyte-like cells, fat droplets were seen in the differentiated cells. These droplets were stained with oil red and shown in red particles. After the differentiation of theca stem cells into osteocyte-like cells, a calcareous matrix was formed, which turned into red after staining by alizarin red.

### Discussion

The OSCs include multipotent stem cells that can express the markers of stem cells and differentiate into osteocyte-like and adipocyte-like cells. According to the characteristics of OSCs, these cells can be used in cell therapy and regenerative medicine.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

The Ethics Committee of [Islamic Azad University of Tehran Medical Sciences Branch](#), approved the study (IR.IAU.TMU.REC.1401.172).

### Funding

This study was conducted through self-funding the author.

### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

### Acknowledgements

The author would like to thank Dr. Mehdi Alikhani.

## مقاله پژوهشی

## بررسی مورفولوژی، مولکولی و قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی تخمدان موش سوری تازه متولدشده

\*سمانه ادیب<sup>۱</sup>

۱. گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب شناختی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

Use your device to scan  
and read the article onlineCitation Adib S. [Morphology and Molecular Studies and Differentiation Ability of Ovarian Stem Cells in Newborn Syrian Ratst (Peasian)]. Qom University of Medical Sciences Journal. 2022; 16(9):756-767. <https://doi.org/10.32598/qums.16.9.2715.1>doi <https://doi.org/10.32598/qums.16.9.2715.1>

## چکیده

تاریخ دریافت: ۰۶ شهریور ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۲۴ مهر ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۱۰ آذر ۱۴۰۱

**زمینه و هدف:** توانایی تمایز سلول‌های بنیادی تخمدان به تخمک و تکا می‌تواند موجب پیشرفت بزرگی در درمان‌های ناباروری شود. در حالی که اطلاعات کمی درباره عملکرد، رشد و پتانسیل تمایز این سلول‌ها وجود دارد. در این مطالعه، ویژگی‌های سلول‌های بنیادی موش تازه متولدشده و پتانسیل تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه‌استخوان و شبه‌چربی بررسی شد.

**روش بررسی:** سلول‌های بنیادی تخمدان موش سوری تازه متولدشده جداسازی و کشت داده شدند. پس از پاساژ سوم با استفاده از PCR بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی (Nang, Oct4, Sox2) در این سلول‌ها بررسی شد. پتانسیل تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه‌استخوانی و چربی مانند با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و اوایل رد تأیید شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند سلول‌های بنیادی جداسازی شده پس از کشت چسبنده بودند. از نظر مورفولوژیکی شبیه به فیبروبلاست بودند و تکثیر می‌شدند. این سلول‌ها، مارکرهای مربوط به سلول‌های بنیادی (Nang, Oct4, Sox2) را بیان کردند. علاوه بر این، ۲۱ روز پس از قرارگیری در محیط تمایزی مخصوص، به سلول‌های شبه‌چربی و شبه‌استخوان تمایز یافتند. در سلول‌های شبه‌چربی قطرات لیپید در این سلول‌ها با رنگ‌آمیزی اوایل رد مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های این مطالعه نشان داد سلول‌های بنیادی تخمدان شامل سلول‌های بنیادی چند توان هستند که قادرند مارکرهای مربوط به سلول‌های بنیادی را بیان کنند و به رده‌های سلولی استخوان، چربی تمایز یابند.

## کلیدواژه‌ها:

سلول‌های بنیادی  
تخمدان، تخمک‌ها،  
سلول‌های تکا،  
سلول‌های گرانولوزا،  
فولیکول تخمدان

## \* نویسنده مسئول:

دکتر سمانه ادیب

نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب شناختی.

تلفن: ۴۴۸۰۷۷۷۶ (۲۱) ۰۹۸+

رایانامه: s.adib@iautmu.ac.ir

## مقدمه

سلول‌های بنیادی که در بافت‌ها بعد از تولد قرار دارند از نوع چند توان هستند که به آن‌ها سلول‌های بنیادی مزانشیمی گفته می‌شود. این سلول‌ها را می‌توان از انواع بافت‌ها مانند مغز استخوان، چربی و غیره استخراج کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با مارکرهای خاص با سطوح بیان متغیر از جمله CD73، CD105، CD90، CD44، مشخص می‌شوند. همچنین این سلول‌ها، نشانگر سلول‌های بنیادی خون‌ساز مانند CD34 و CD45 و همچنین نشانگر سلول‌های اندوتلیال CD31 را بیان نمی‌کنند.

افزون بر این می‌توان گفت این سلول‌ها مارکرهای مخصوص سلول‌های بنیادی از قبیل Nanog، Pou5f، Sox2 را نیز بیان می‌کنند. این سلول‌های شبه فیبروبلاست غیرخون‌ساز، تمایز نیافته، با خاصیت چسبندگی هستند. آن‌ها می‌توانند به‌طور گسترده تکثیر شوند و قابلیت تمایز به چندین نوع سلول از منشأ مزودرمی و غیرمزودرمی مانند سلول‌های استخوان و سلول‌های چربی را دارند [۶، ۷].

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی تخمدان موش سوری جداسازی و خصوصیات آن‌ها بررسی شدند، زیرا شناخت دقیق مشخصات این سلول‌ها، نه تنها در ناباروری و رشد آزمایشگاهی فولیکول می‌تواند مؤثر باشد، بلکه در پزشکی احیاکننده<sup>۱</sup> و سلول‌درمانی نیز بسیار ارزشمند است. سلول‌های بنیادی تخمدان از نظر بیان برخی از ژن‌های نشانگر و توانایی تمایز آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی به سلول‌های شبه‌استخوانی و شبه‌چربی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شدند.

## روش بررسی

### جداسازی سلول‌های بنیادی از تخمدان

ابتدا موش‌های سوری نژاد (DBA2) تازه متولدشده (به تعداد ۵ عدد) با روش قطع نخاع گردنی قربانی شدند. سپس تخمدان‌ها (۱۰ عدد) جداسازی و به زیر لوپ منتقل شدند. پس از قطعه قطعه کردن بافت تخمدان با سوزن مربوط به سرنگ انسولین، بقایای بافت تخمدان در کلاژناز (۰/۰۱ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه در آنکوباتور قرار داده شد و هر ۵ دقیقه پیتاژ شد. سپس با سرم ۳۰ درصد خنثی و محتویات از فیلتر مش ۷۰ رد شد و سلول‌ها ۲ بار با PBS شست‌وشو داده شدند.

سانتریفیوژ (۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. رسوب سلول‌ها در زیر هود مخصوص کشت سلولی به درون یک فلاسک ۲۵ سانتی‌متری تخلیه و در محیط کشت DMEM/F12 و FBS ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس در آنکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO<sub>2</sub> ۵ درصد و شرایط رطوبت ۹۵ درصد برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و پس از یک روز این

تخمدان یک غده درون‌ریز است که ترشحات خود را مدیون سلول‌های گرانولوزا و نکاست. در بافت تخمدان علاوه بر فولیکول‌ها (شامل اووسیت و سلول‌های پشتیبان آن، یعنی گرانولوزا و تکا) که در مراحل تکاملی مختلفی قرار دارند، سلول‌های بنیادی نیز وجود دارد. این سلول‌های بنیادی می‌توانند در قشر، اپیتلیوم، مرز بین قشر و مرکز (مدولا) تخمدان قرار داشته باشند. مطالعات جدید نشان دادند که سلول‌های بنیادی تخمدان قادرند به اووسیت و سلول‌های پشتیبان اووسیت تمایز یابند. به پدیده تمایز سلول‌های بنیادی تخمدان به اووسیت نئوژنزیس می‌گویند.

محققان در گذشته بر این باور بودند که تعداد فولیکول‌های بدوی در تخمدان پس از تولد ثابت است. این تعداد ثابت از دوران جنینی تعیین می‌شود، اما مطالعات جدید ثابت کردند که در تخمدان نئوژنزیس نیز رخ می‌دهد. این پدیده تغییرات قابل توجهی در بیولوژی تولید مثل و تحقیقات ناباروری ایجاد کرد و از این رو، وجود سلول‌های بنیادی در تخمدان پستانداران پس از تولد ثابت شد [۱، ۲].

علاوه بر این، سلول‌های بنیادی تخمدان قادرند به سلول‌های تکا نیز تمایز یابند [۳]. در فولیکول بدوی سلول‌های تکا هنوز آرایش کاملی ندارند. به‌طور کلی می‌توان گفت در مرحله اولیه رشد فولیکول این لایه به‌صورت واضح و منظم دیده نمی‌شود. این سلول‌ها در مرحله فولیکول ثانویه به بعد دیده می‌شوند. وجود سلول‌های تکا برای فولیکول‌نئوژنزیس ضروری است، زیرا سلول‌های تکا همراه با سلول‌های گرانولوزا نقش مهمی در تولید هورمون‌های استروئیدی دارند. با وجود این که شکل‌گیری سلول‌های تکا برای وقایع فیزیولوژی رشد و تکامل فولیکول مهم است، اطلاعات اندکی درباره شکل‌گیری سلول‌های تکا در طول رشد فولیکول وجود دارد. در دهه اخیر محققین نشان دادند سلول‌های تکا در تخمدان، ۲ منشأ جنین‌شناسی متفاوت دارد که مارکرهای ملکولی متفاوتی را بیان می‌کنند و سپس به تخمدان مهاجرت می‌کنند [۴].

نکته قابل توجه و مهم این است که سلول‌های تکا، ۲ لایه تکای داخلی و خارجی دارند. لایه داخلی حاوی سلول‌های ایمنی، مویرگ‌های بسیار ریز خونی، سلول‌های بنیادی و سلول‌های استروئیدی است که گیرنده LH روی این سلول‌هاست و این سلول‌ها قادرند آندروژن ترشح کنند. این در حالی است که سلول‌های لایه خارجی بیشتر شبه فیبروبلاست و عضله صاف هستند. لایه اخیر حاوی عروق لنفاوی و خونی ورشته‌های عصبی و قابل انقباض است. محققان بر این باورند که سلول‌های بنیادی تکای جداسازنده از تخمدان قادرند هر ۲ لایه خارجی و داخلی تکا را در شرایط آزمایشگاهی تشکیل دهند [۵].

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده

Accession number	Length(bp)	'Sequences 5'---3	Gene name
NM_013633	129	F: GAA CTA GCA TTG AGA ACC GT R: CAT ACT CGA ACC ACA TCC TTC	OCT4
NM_028016.2	235	F: CTGATTCTTCTACCAGTCCCA R: AAACCAGGTCTAACCTGCTTAT	Nanog
NM_001109181.1	341	F: AACCCACCAATCCCATCCAAA R: CATTGATTGCCATGTTTATCTCG	Sox2
NM_023279.3	81	F: GGGCTCCCAGGTTAAAGTCC R: AAAATGGGGAGGACAGAGCC	Beta-tubulin


 مجله  
 دانشگاه علوم پزشکی قم

بعدی ذخیره شد.

### تحلیل بیان ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی با روش RT-PCR

سطح بیان ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی تخمدان شامل Nanog، Oct4، Sox2 با روش RT-PCR ارزیابی شد. از ژن Be-tubulin به عنوان ژن مرجع استفاده شد. لیست پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش در **جدول شماره ۱** آمده است. روش RT-PCR بر اساس راهنمای کیت مربوطه انجام و برای انجام واکنش از کیت Promega (M7502) استفاده شد. قطعات تکثیر شده از هر نمونه با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

### تمایز سلول‌های بنیادی تخمدان به سلول‌های شبه چربی

پس از آماده‌سازی محیط کشت تمایزی [۱]، سلول‌های بنیادی بعد از پاساژ سوم سانتریفیوژ شدند. سپس در محیط کشت تمایزی به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. محیط کشت هر ۳ روز یک‌بار تعویض می‌شد.

### رنگ‌آمیزی اوایل رد<sup>۲</sup>

ابتدا محیط کشت تمایزی روی سلول‌ها تخلیه شد. سپس سلول‌های باقی‌مانده با PBS شسته شدند. سلول‌ها با پارافورمالدهید ۰/۴ درصد به مدت ۱ ساعت فیکس و ۲۰ دقیقه با رنگ (Sigma، Germany) اوایل رد رنگ‌آمیزی شدند. پس از شست‌وشو با اتانول ۷۰ درصد و در نهایت، شست‌وشو با آب، قطرات چربی در سلول‌ها رنگ شدند و زیر میکروسکوپ اینورت مشاهده و عکس برداری شدند.

### تمایز سلول‌های بنیادی تخمدان به سلول‌های شبه استخوان

پس از آماده‌سازی محیط کشت تمایزی [۱]، سلول‌های

2. Oil Red

محیط تعویض شد. به هنگام تعویض محیط، سلول‌ها با PBS استریل شسته شدند. سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند با تعویض محیط از فلاسک خارج شدند. پس از آن، تعویض محیط هر روز و برای ۲ تا ۳ روز تا تخلیه کامل سلول‌های خونی، خون‌ساز و دبریدمان و پر شدن بیش از ۸۰ درصد کف فلاسک ادامه یافت.

سلول‌ها از ابتدا روزانه از نظر مورفولوژی و شرایط عمومی توسط میکروسکوپ اینورت بررسی شد. بعد از ۳ تا ۴ روز سلول‌ها بر اثر تکثیر، کف فلاسک‌ها را پر کردند و در این هنگام پاساژ اول برای کشت سلول انجام شد که در این عمل با استفاده از محلول تریپسین EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. به وسیله پیپتاژ کردن، سلول‌ها از همدیگر جدا شدند و بعد از این مرحله، عمل سانتریفیوژ سلول‌ها انجام شد.

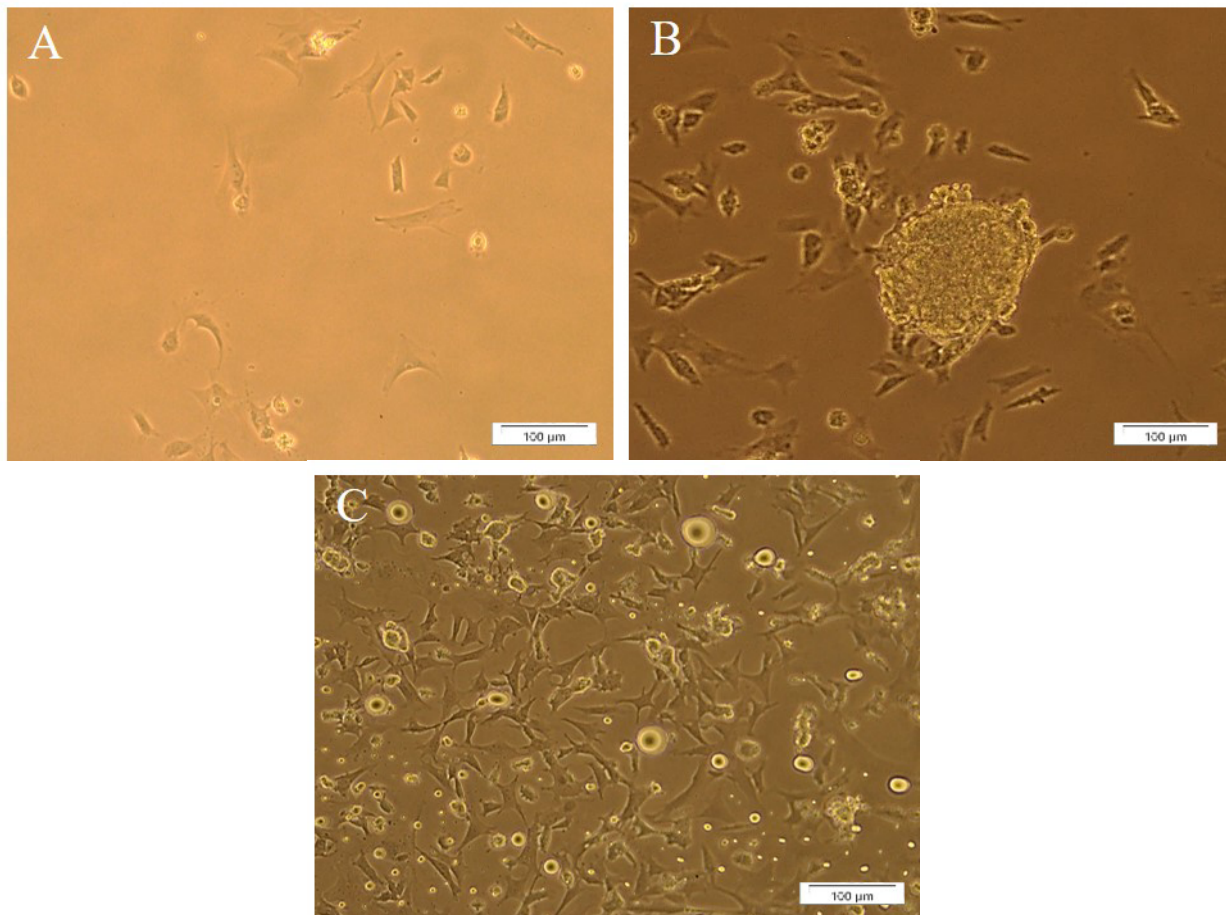
بعد از عمل سانتریفیوژ، محتویات رویی لوله فالکن تخلیه، مقداری محیط کشت به داخل تیوپ حاوی سلول اضافه و مجدداً عمل پیپتاژ انجام شد. محتویات داخل لوله فالکن مجدداً به داخل ۳ فلاسک مخصوص کشت ریخته شد و در داخل انکوباتور ۳۷ درجه با شرایط مرطوب و CO<sub>2</sub> مناسب قرار گرفت. بعد از ۳ پاساژ مکرر سلول‌های کاملاً یکدست و با ظاهری کاملاً شبیه به هم در کف فلاسک باقی ماندند که آمادگی لازم را برای بررسی داشتند.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

RNAهای کل از سلول‌های بنیادی تخمدان با بافر Trizol (Invitrogen) استخراج شد. آلودگی ناخواسته DNA در RNAهای استخراج شده به کمک DNase I هضم شد. پس از آن، غلظت و خلوص RNA توسط اسپکتروفتومتر

(Thermo Fisher Scientific) تعیین شد. اولین رشته cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Maxima H Minus First Strand (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) سنتز و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده





مجله  
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۱. سلول‌های بنیادی تخمدان موش سوری تازه متولدشده بعد از کشت در زمان‌های مختلف. سلول‌های دوکی و چسبیده‌شده به کف پلیت ۱ روز پس از کشت (A)، تشکیل کلونی ۳ روز پس کشت (B)، پر شدن کف پلیت ۵ روز پس از کشت سلول‌ها (C).

از گذشت ۸ ساعت، این سلول‌ها کم‌کم به کف پلیت چسبیدند و ۲۴ ساعت بعد شروع به تشکیل کلونی در مرحله کشت اولیه کردند. این کلونی‌ها ترکیبی از سلول‌های پهن‌شده، دوکی، گرد و بلند بودند (تصویر شماره ۱). بعد از پاساژ سوم این سلول‌ها به‌صورت یک جمعیت یکدست بودند که تقریباً همه آن‌ها به کف ظرف چسبیده بوده و دوکی و کشیده شده بودند. این سلول‌ها ظاهری شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی داشتند.

#### بررسی بیان ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی

ژن‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی پر توانی مانند Sox2، Oct4، Nanog، در این مطالعه بررسی شدند که سلول‌های بنیادی هر ۳ ژن را بیان کردند (تصویر شماره ۲).

#### تمایز سلول‌های بنیادی تکا به سلول‌های شبه‌چربی

به دنبال تمایز سلول‌های بنیادی تکا به سلول‌های شبه‌چربی، در سلول‌های تمایز یافته قطرات چربی دیده شد. این قطرات چربی با رنگ اوایل رد رنگ‌آمیزی و به صورت ذرات قرمز رنگ

بنیادی پس از پاساژ سوم سانتریفیوژ شدند و سپس در محیط کشت تمایز به استخوان به‌مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. محیط کشت هر ۳ روز یک‌بار تعویض می‌شد.

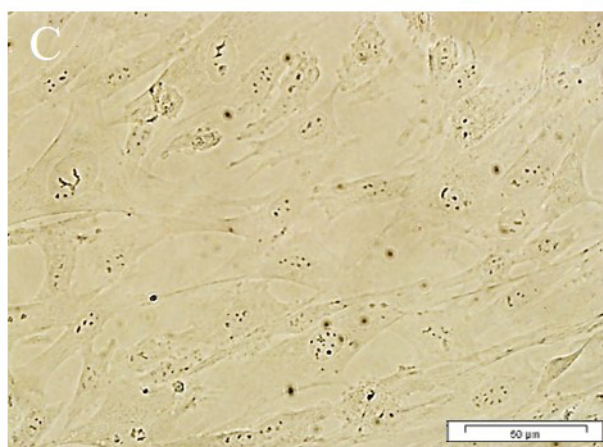
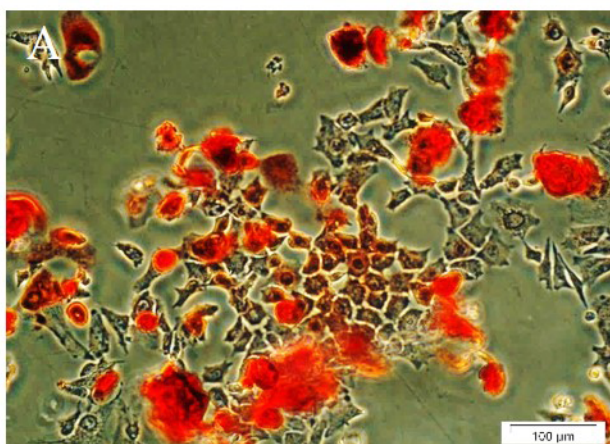
#### رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

ابتدا محیط روی سلول‌ها تخلیه شد. سپس سلول‌ها با PBS شسته شدند. سلول‌ها با متانول به‌مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند و ۱۰ دقیقه با رنگ آلیزارین رد (سیگما-آلمان) رنگ‌آمیزی شدند. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با آب، مواد آهکی در سلول‌ها و ماتریکس مینرالیزه رنگ‌شده زیر میکروسکوپ اینورت مشاهده و عکس‌برداری شدند.

#### یافته‌ها

#### مورفولوژی سلول‌های بنیادی تخمدان

سلول‌های بنیادی قبل از کشت به‌صورت گرد و مدور بودند. زمانی که در پلیت قرار داده شدند به کف پلیت نچسبیدند. پس



**تصویر ۲.** بررسی مارکرهای مخصوص سلول‌های بنیادی در سلول‌های بنیادی تخمدان موش سوری تازه متولدشده با تکنیک PCR. بیان شدن هر ۳ مارکر مخصوص سلول‌های بنیادی در سلول‌های بنیادی مستخرج‌شده از تخمدان موش سوری.

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی تخمدان به راحتی در شرایط آزمایشگاهی جداسازی شدند. بعد از جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مورفولوژی و قدرت تکثیر آن‌ها بررسی شد. سپس مارکرهای خاص سلول‌های بنیادی نیز بررسی شد. علاوه بر این، توانایی تمایز این سلول‌ها نیز بررسی شد.

در کشت اولیه، سلول‌های بنیادی تکا، تجمع یافتند و کلونی تشکیل دادند، اما بعد از ۳ پاساژ به صورت جمعیت یکدستی دیده شدند. این سلول‌ها بعد از ۳ پاساژ چسبنده و دوکی بودند. این مورفولوژی در سلول‌های بنیادی مغز استخوان از گونه‌های مختلف مثل گوسفند [۸] و انسان [۹] نیز دیده شده است. همچنین در این مطالعه، بیان ترانس کریپشن فاکتورهای مهم که برای سلول‌های بنیادی ضروری است، بررسی شد. این مارکرها شامل Pou5f1، Nanog، Sox2 بودند [۱۰] بیان این فاکتورها در سلول‌های بنیادی اولیه و پرتوان گزارش شده است [۱۱].

علاوه بر این، مطالعات قبلی ثابت کردند که هر ۳ فاکتور فوق در سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان انسان و گوسفند

دیده شدند (تصویر شماره ۳). این بررسی ۲۱ روز پس از تمایز انجام شد.

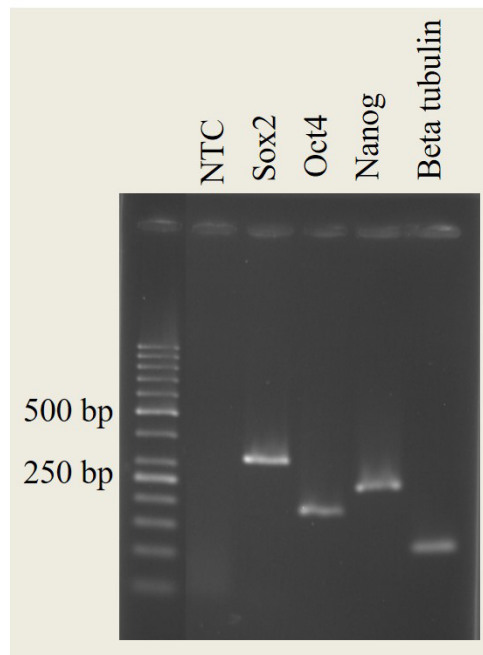
### تمایز سلول‌های بنیادی تکا به سلول‌های شبه‌استخوان

بعد از تمایز سلول‌های بنیادی تکا به سلول‌های شبه‌استخوان، ماتریکس آهکی شکل گرفت که پس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با آلیزارین رد این قسمت‌ها به رنگ قرمز درآمدند (تصویر شماره ۳). این بررسی ۲۱ روز پس از تمایز انجام شد.

### بحث

امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی نقش بسزایی در درمان بیماری‌ها دارد. استفاده از سلول‌های بنیادی تخمدان و تمایز آن‌ها به سایر رده‌های سلولی از قبیل اووسیت و سلول‌های پشتیبان تکا در راستای درمان ناباروری می‌تواند نقش مهمی داشته باشد. علاوه بر این، می‌توان از این سلول‌ها در سلول‌درمانی برای سایر بیماری‌ها نیز استفاده کرد.





مجله  
دانشگاه علوم پزشکی قم

**تصویر ۴.** تمایز سلول‌های بنیادی تخمدان موش سوری به سلول‌های شبه‌استخوان و شبه‌چربی. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ۲۱ روز پس از قرارگیری سلول‌ها در محیط تمایزی استخوان (A). رنگ‌آمیزی اوایل رد ۲۱ روز پس از قرار گرفتن سلول‌ها در محیط تمایزی چربی (B). سلول‌های بنیادی ۲۱ روز پس از کشت در محیط کشت ساده (C).

تمایز به استخوان و چربی را دارند. نتایج مطالعه حاضر بر روی سلول‌های بنیادی تکای مشتق از تخمدان گوسفند، خوک و انسان نیز مشابه یافته‌های این مقاله بود.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد سلول‌های بنیادی تخمدان، شامل سلول‌های بنیادی چند توان هستند که قادرند نشانگرهای مربوط به سلول‌های بنیادی را بیان کنند و به رده‌های سلولی از قبیل سلول‌های شبه‌استخوان و شبه‌چربی تمایز یابند. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این است که باتوجه به خصوصیات سلول‌های بنیادی حاصل از تخمدان، این سلول‌ها نیز می‌توانند در سلول‌درمانی و پزشکی احیاکننده<sup>۲</sup> استفاده شود.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران این مطالعه را با شناسه (IR.IAU.TMU.REC.1401.172) تأیید کرد.

نیز بیان می‌شوند [۱، ۳]. Oct4 یک ترانس کریپشن فاکتور شناخته‌شده برای سلول‌های پرتوان است و به نظر می‌رسد نقش کلیدی در پایه‌ریزی و تعیین هویت رده سلول‌های زایا دارد. محققان اخیراً نشان داده‌اند که Oct4 در سلول‌های زایا نیز بیان می‌شود. نتایج تحقیقات قبلی نشان دادند سلول‌های زایا می‌توانند لابلای سلول‌های بنیادی تخمدان حضور داشته باشند [۱۲].

در مطالعه‌ای که قبلاً روی سلول‌های بنیادی تکای گوسفند انجام شد، نشان داده شد سلول‌های بنیادی تکای گوسفندی مارکر Oct4 را بیشتر از Nanog بیان کردند و این در حالی بود که فاکتور Nanog بیشتر از Sox2 بیان شد. علاوه بر این، محققان در این مطالعه نشان دادند هر ۳ فاکتور در تخمدان جنین گوسفندی بیان بسیار قابل ملاحظه و بالایی داشت [۱]. در مطالعه دیگری که بر روی سلول‌های بنیادی تکای خوکی انجام شد، محققان نشان دادند این سلول‌های چند توان، توانایی بیان مارکرهای Oct4 و Nanog را ندارند، اما همچون سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند تکثیر شوند و پس از چند پاساژ به جمعیت یکدستی تبدیل می‌شوند. در حالی که آن‌ها نشان دادند این سلول‌ها می‌توانند فاکتور Sox2 را بیان کنند [۱۳].

تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه‌استخوان و سلول‌های شبه‌چربی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و اوایل رد تأیید شد. یافته‌های مطالعه قبلی نشان داده است سلول‌های چند توان مشتق از سلول‌های مغز استخوان [۱۴] و چربی [۱۵] نیز توانایی

#### حامی مالی

تأمین منابع مالی آن به عهده نویسنده بوده است.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

#### تشکر و قدردانی

نویسنده مقاله از مهدی علیخانی کمال تشکر و قدردانی را دارد.

## References

- [1] Adib S, Valojerdi MR. Molecular assessment, characterization, and differentiation of theca stem cells imply the presence of mesenchymal and pluripotent stem cells in sheep ovarian theca layer. *Res Vet Sci.* 2017; 114:378-87. [DOI:10.1016/j.rvsc.2017.06.021] [PMID]
- [2] Porras-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. Neo-oogenesis in mammals. *Zygote.* 2017; 25(4):404-22. [DOI:10.1017/S0967199417000363] [PMID]
- [3] Dalman A, Totonchi M, Valojerdi MR. Human ovarian theca-derived multipotent stem cells have the potential to differentiate into oocyte-like cells in vitro. *Cell J.* 2019; 20(4):527-36. [doi:10.22074/cellj.2019.5651]
- [4] Schubert C. Theca cell source. *Biol Reprod.* 2015; 93(2):26. [DOI:10.1095/biolreprod.115.131383]
- [5] Young JM, McNeilly AS. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010; 140(4):489-504. [DOI:10.1530/REP-10-0094] [PMID]
- [6] Ghaneialvar H, Soltani L, Rahmani HR, Lotfi AS, Soleimani M. Characterization and classification of mesenchymal stem cells in several species using surface markers for cell therapy purposes. *Indian J Clin Biochem.* 2018; 33(1):46-52. [DOI:10.1007/s12291-017-0641-x] [PMID] [PMCID]
- [7] Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol.* 2013; 28(9):1109-16. [doi:10.14670/hh-28.1109]
- [8] Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Eslaminejad MB, Sedighi-Gilani M. Derivation of male germ cells from ram bone marrow mesenchymal stem cells by three different methods and evaluation of their fate after transplantation into the testis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2016; 52(1):49-61. [DOI:10.1007/s11626-015-9945-4] [PMID]
- [9] Adib S, Tiraihi T, Darvishi M, Taheri T, Kazemi H. Cholinergic differentiation of neural stem cells generated from cell aggregates-derived from Human Bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Regen Med.* 2015; 12:43-52. [DOI:10.1007/s13770-014-0019-6]
- [10] Wang KH, Kao AP, Chang CC, Lin TC, Kuo TC. Upregulation of Nanog and Sox-2 genes following ectopic expression of Oct-4 in amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2015; 62(5):591-7. [DOI:10.1002/bab.1315] [PMID]
- [11] Swain N, Thakur M, Pathak J, Swain B. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020; 24(2):368-73. [DOI:10.4103/jomfp.JOMFP\_22\_20] [PMID] [PMCID]
- [12] Cheng L, Thomas A, Roth LM, Zheng W, Michael H, Karim FWA. OCT4: A novel biomarker for dysgerminoma of the ovary. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28(10):1341-6. [DOI:10.1097/01.pas.0000135528.03942.1f] [PMID]
- [13] Lee YM, Kumar BM, Lee JH, Lee WJ, Kim TH, Lee SL, et al. Characterisation and differentiation of porcine ovarian theca-derived multipotent stem cells. *Vet J.* 2013; 197(3):761-8. [DOI:10.1016/j.tvjl.2013.04.011] [PMID]
- [14] Sun Q, Nakata H, Yamamoto M, Kasugai S, Kuroda S. Comparison of gingiva-derived and bone marrow mesenchymal stem cells for osteogenesis. *J Cell Mol Med.* 2019; 23(11):7592-601. [DOI:10.1111/jcmm.14632] [PMID] [PMCID]
- [15] Sanghani-Kerai A, Black C, Cheng SO, Collins L, Schneider N, Blunn G, et al. Clinical outcomes following intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis in dogs characterized by weight-bearing asymmetry. *Bone Joint Res.* 2021; 10(10):650-8. [DOI:10.1302/2046-3758.1010.BJR-2020-0540.R1] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank