Archive of SID

بهبود رشد آزمایشگاهی فولیکول‌های ثانویه جداشده از تخمدان گاو با تحریک مسیر سیگنالینگ Akt

سیما همتیان خیاط[۱]، ابوالفضل شیرازی[۲،۳*]، ناصر شمس اسفندآبادی[۴]، سید عباس میرزایی[۵]، حسن نظری[۶]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی فناوری‌های تولیدمثل در دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. استاد، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران- ایران.
۳. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۵. دانشیار، گروه ژنتیک، زیست فناوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۶. استادیار، پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۲۰ تیرماه ۹۷ **پذیرش:** ۲۶ شهریورماه ۹۷

چکیده

تکامل فولیکول‌های تخمدانی در حال رشد با عمل هماهنگ مسیرهای سیگنالینگ متعدد تنظیم می‌شود. در این راستا و به منظور کشت آزمایشگاهی فولیکول‌های نابالغ، به‌کارگیری برخی از تحریک کننده یا مهارکننده‌های مسیرهای سیگنالینگ می‌تواند در بهینه‌سازی شرایط کشت این دسته از فولیکول‌ها مؤثر باشد. هدف از این مطالعه تحریک رشد فولیکول‌های ثانویه (<۸۰ میکرومتر) تخمدان گاو در محیط آزمایشگاهی با تقلید از فرایند تکوین فولیکول‌ها در شرایط درون‌تنی و همچنین تحریک مسیر سیگنالینگ Akt، با PS48 به عنوان محرک این مسیر است؛ به همین منظور فولیکول‌های ثانویه کوچک با روش هضم آنزیمی از تخمدان‌های کشتارگاهی جدا و در چهار گروه شامل محیط کشت حاوی BSA، FBS، PS48 و حضور توأم FBS و PS48 به مدت ده روز کشت داده شدند و از نظر میزان رشد ارزیابی گردیدند. اندازه فولیکول در همه گروه‌های آزمایشی طی ده روز کشت افزایش داشت (P<۰/۰۵). بیشترین رشد در گروه FBS+PS48 مشاهده شد، درحالی‌که کمترین رشد در گروه PS48 بود. از سوی دیگر، اگرچه گروه حاوی FBS سرعت رشد فولیکول را افزایش داد، رشد فولیکول‌ها در حضور FBS در ترکیب با PS48 موثرتر بود. در نتیجه، در شرایط مطالعه‌ی ما بهترین نتایج در رشد فولیکولی زمانی به دست آمد که محیط کشت با FBS+PS48 تکمیل شد.

واژه‌های کلیدی: گاو، کشت آزمایشگاهی، فولیکول‌های ثانویه، مسیر سیگنالینگ Akt، PS48.

مقدمه

تخمدان پستانداران از واحدهای عمل‌کردی به نام فولیکول تشکیل شده است. تکامل فولیکول طی دوره جنینی به دنبال تشکیل فولیکول‌های ابتدایی (primordial) آغاز می‌شود و با شروع رشد، فولیکول‌های ابتدایی فعال می‌شوند و به فولیکول‌های اولیه (primary)، ثانویه (secondary) و حفره‌دار (antral) تکامل می‌یابند. تعداد فولیکول‌های تخمدان از همان ابتدای دوران جنینی تعیین می‌شوند و تخلیه این مخزن فولیکولی منجر به پیری تولیدمثلی می‌شود (۳). کشت فولیکول به صورت برون تنی علاوه بر درک مکانیسم‌های دخیل در فعال‌سازی فولیکول‌های ابتدایی و آشنایی با دینامیک فولیکولی (۱) موجب بازگشت امید به حفظ باروری در دختران و زنان مبتلا به سرطان می‌شود که فرایند درمان را با موفقیت پشت سر گذاشته‌اند و باروری با کمک تکنیک‌هایی نظیر انجماد و کشت بافت تخمدان قابل تحقق است (۶). پس از کشت بافت تخمدان و یا فولیکول‌های اخذ شده از بافت تخمدانی، تخمک‌های نابالغ

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: Shiraziabbas@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

حاصل از فولیکول‌های پری‌آنترال در تکنیک‌های کمک تولیدمثلی (Assisted Reproductive Technologies) همانند بلوغ آزمایشگاهی تخمک به منظور تولید رویان در انسان و در کنار آن تولید حیوانات چند رگه و حفظ گونه‌های در معرض خطر انقراض در حیوان قابل استفاده‌اند (۳). در زمینه کشت فولیکول‌های تخمدانی، بزرگ‌ترین چالش، انتخاب سیستم و محیط کشت مناسب به منظور بهبود رشد و تکامل فولیکول‌های مراحل مختلف است.

یکی از اصلی‌ترین مسیرهای تنظیم کننده توقف و یا رشد فولیکول‌های تخمدانی، مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt است. مولکول میانجی این مسیر PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1) است که می‌تواند Akt و برخی پروتئین کینازها نظیر S6K1 (Ribosomal protein S6 kinase beta-1) و SGK1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) را فسفریله و فعال کند (۲). فسفریلاسیون Akt با سرکوب فعالیت رونویسی FOXO3 موجب فعال‌سازی فولیکول‌های ابتدایی می‌شود؛ چراکه FOXO3 رونویسی ژن‌های محرک آپوپتوز را افزایش می‌دهد. همچنین Akt منجر به افزایش بقا و حیات سلول‌ها با مهار BAD (Bcl-2-associated death promoter) که از اعضای خانواده BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) است، می‌شود. از سویی دیگر Akt با غیرفعال کردن Tsc2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) و تنظیم فعالیت mTORC1 (mammalian target of rapamycin)، رشد سلولی را بیشتر می‌کند. mTORC1 و PDK1، با فعال کردن S6K1 و SGK1 ترجمه پروتئین و سنتز ریبوزوم را در تخمک بهبود می‌بخشند (۱۸). در مطالعات متعددی، بهبود تکامل فولیکول در شرایط آزمایشگاه به واسطه افزودن مواد تحریک کننده مسیر PI3K و مهارکننده مسیر PTEN (Phosphatase and tensin homolog) گزارش شده‌است. PS48 با عنوان کامل (Z)-5-(4-Chlorophenyl)-3-phenylpent-2-enoic acid آگونیست آلوستریک PDK1 است که قادر به فعال‌سازی Akt است (۱۹).

هدف از مطالعه حاضر بررسی مسیر سیگنالینگ موثر در رشد و تکامل فولیکول‌های تخمدانی در گاو است، تا بتوان با تحریک مسیر سیگنالینگ Akt با PS48 موجب بقا و تداوم رشد فولیکول‌های مراحل ثانویه کوچک تا مراحل بالاتر شد؛ چراکه PS48 موجب مهار پروتئین FOXO3 (به عنوان مهارکننده فاکتورهای موثر در رشد و تکثیر سلول) می‌شود و در کاهش آپوپتوز و افزایش تکثیر سلول‌ها مؤثر است،

مواد و روش کار

مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه ساخت شرکت سیگما (آمریکا) بودند مگر در مواردی که ذکر خواهد شد.

تخمدان‌های گاوی از کشتارگاه جونقان در کمتر از ۲ ساعت در ترموفلاسک حاوی سرم فیزیولوژی ۲۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید و پس از شست و شو با الکل ۷۰٪ در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا بلافاصله قطعات تخمدانی تهیه شوند.

به‌منظور تهیه قطعات تخمدانی، هر تخمدان از وسط دو نیم شده و سپس ناحیه‌ی مدولا حذف و کورتکس با تیغ اسکالپل تا رسیدن به قطر ۳ میلی‌متری کورتکس تراشیده می‌شد. پس از آن ناحیه قشری به دست آمده به قطعات ۰/۵ میلی‌متر مکعبی تقسیم و به منظور هضم آنزیمی، قطعات بافتی به ۵ میلی‌لیتر محیط Krebs-ringer bicarbonate حاوی ۱۸۰ واحد I Dnase و ۱۲۴۰ واحد کلاژناز نوع I منتقل شد و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده

www.SID.ir

Archive of SID

شدند (۶)، سپس محتوای لوله کونیکال به مدت ۵ دقیقه با دور حداکثر ورتکس شده و هم حجم محتوای درون لوله به آن، H-TCM حاوی ۱۰٪ سرم به‌منظور غیرفعال شدن آنزیم‌ها اضافه شد. در نهایت به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و به پلت حاصل ۵ میلی‌لیتر H-TCM (Tissue Culture Medium) سرد حاوی PVA (Polyvinyl alcohol) (۳ml/mg) و BSA (Bovine Serum Albumin) (۴ml/mg) اضافه شد (۷). در نهایت فولیکول‌های ثانویه کوچک (<۸۰ میکرومتر) زیر لوپ با بزرگ‌نمایی ۹۰، جدا و سه بار در محیط H-TCM حاوی ۱۰٪ سرم شست و شو شدند.

به منظور جلوگیری از اتصال سلول‌های گرانولوزا به کف پتری‌دیش در طی کشت فولیکول‌های تخمدانی و ارتباط موثرتر آن‌ها با فولیکول و تخمک از کشت ۳ بعدی آلژینات استفاده شد. پس از حذف ترکیبات آلی مضر از سدیم آلژینات با زغال فعال و تهیه آلژینات با غلظت نهایی ۱٪، فولیکول‌ها در قطرات ۵ میکرولیتری از آلژینات قرار گرفتند و سپس به‌منظور شکل‌گیری داربست، قطرات آلژینات در بافر $CaCl_2$ به مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از آن دانه‌های شکل گرفته حاوی فولیکول به قطرات ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت پایه (bicarbonate TCM حاوی ۱۰ میکرولیتر FSH، ۱ درصد ITS و ۱۰۰µg/ml اسید آسکوربیک) منتقل شدند.

در اکثر مطالعات، کشت فولیکول به منظور غنی‌سازی محیط کشت رشد از سرم (FBS یا BSA) استفاده شده‌است. در این مطالعه فولیکول‌های ثانویه سالم (<۸۰ میکرومتر) برای کپسوله کردن با آلژینات انتخاب شدند. هر ۳-۴ فولیکول در یک قطره به مدت ۱۰ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 کشت داده شدند که تعداد نهایی فولیکول‌های کشت شده نیز برای هر گروه ۲۰ عدد بود. برای این منظور فولیکول‌های ثانویه کوچک پس از جمع‌آوری و شست و شو در چهار گروه کشت شدند. در گروه اول به محیط پایه در تمام مدت کشت BSA (۳ml/mg) اضافه شد. در گروه دوم به محیط پایه در تمام مدت کشت FBS (۱۰٪) اضافه شد. در گروه سوم به محیط کشت پایه تنها در ۴۸ ساعت ابتدایی PS48 (۵ µM) اضافه گردید (۸) و در گروه چهارم به محیط پایه در ۴۸ ساعت ابتدایی کشت PS48+FBS و در روزهای آتی کشت FBS افزوده شد. در طول کشت نیمی از محیط کشت هر یک روز در میان عوض شد؛ در نهایت قطر فولیکول‌ها با نرم‌افزار Image J 1.46r اندازه‌گیری شد و داده‌های حاصل از رشد فولیکولی پس از ۵ بار تکرار با طرح آزمایشی بلوک کاملا تصادفی با داده‌های چندمشاهده‌ای و آزمون تکمیلی دانکن با نرم‌افزار Statistical Analysis System (SAS) ویرایش و تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

پس از ده روز کشت فولیکول‌های ثانویه، رشد در تمام گروه‌ها مشاهده شد. هر چه به روز ۱۰ نزدیک‌تر می‌شد، سرعت رشد فولیکول‌ها کاهش پیدا می‌کرد. بین تمام گروه‌ها بجز روز اول، اختلاف در رشد فولیکولی مشاهده شد. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، میزان رشد فولیکولی در گروه FBS به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه BSA بود (P<۰/۰۵) و کمترین میزان رشد فولیکولی در گروه PS48 مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان رشد فولیکولی نیز در گروه FBS+PS48 مشاهده شد که نسبت به گروه FBS اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). شکل ۱ رشد فولیکول ثانویه بعد از ده روز کشت را نشان می‌دهد.

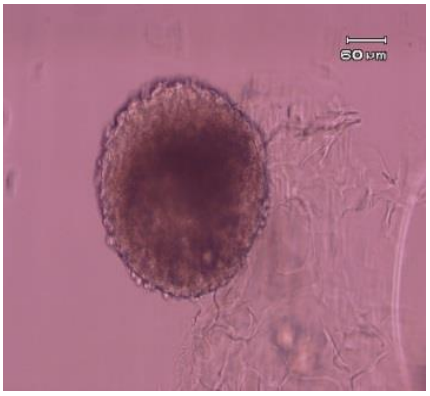
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- میانگین ± انحراف معیار اندازه (µm) فولیکول‌های کوچک ثانویه در طول ده روز کشت در آلژینات یک درصد

روز	گروه‌های آزمایشی			
	PS48	BSA	FBS	FBS+PS48
۰	۸۴ ± ۳/۱۵۵^{A,a}	۸۳ ± ۳/۱۵۵^{A,a}	۸۶ ± ۳/۱۵۵^{A,a}	۸۶ ± ۳/۱۵۵^{A,a}
۲	۱۰۳/۳±۶/۱۵۵^{A,b}	۱۱۱/۳±۳/۱۵۵^{B,b}	۱۳۳/۳±۱/۱۵۵^{C,b}	۱۴۹/۳±۲/۱۵۵^{D,b}
۴	۱۱۳/۳±۳/۱۵۵^{A,c}	۱۲۰/۳±۷/۱۵۵^{B,c}	۱۷۴/۳±۱/۱۵۵^{C,c}	۱۸۹/۳±۲/۱۵۵^{D,c}
۶	۱۱۹/۳±۶/۱۵۵^{A,c,d}	۱۲۸/۳±۹/۱۵۵^{B,c,d}	۲۰۹/۳±۲/۱۵۵^{C,d}	۲۱۹ ± ۳/۱۵۵^{D,d}
۸	۱۲۴/۳±۸/۱۵۵^{A,d,e}	۱۳۵ ± ۳/۱۵۵^{B,d,e}	۲۳۵/۳±۱/۱۵۵^{C,e}	۲۴۶/۳±۱/۱۵۵^{D,e}
۱۰	۱۲۹/۳±۸/۱۵۵^{A,e}	۱۳۹/۳±۸/۱۵۵^{B,e}	۲۴۵/۳±۱/۱۵۵^{C,f}	۲۵۱ ± ۳/۱۵۵^{D,e}

$^{a-f}$ حروف نامتشابه کوچک در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).
$^{A-D}$ حروف نامتشابه بزرگ در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).



شکل ۱- فولیکول ثانویه بعد از ده روز کشت

بحث

بزرگ‌ترین چالش در زمینه کشت فولیکول‌های تخمدانی انتخاب سیستم و محیط کشت مناسب به منظور بهبود رشد و تکامل فولیکول‌های مراحل مختلف است. اساسا دو سیستم برای کشت فولیکول‌های قبل از مرحله آنترال وجود دارد: کشت فولیکول‌های جداسازی شده و کشت فولیکول‌ها در قالب کشت قطعات کورتکس تخمدانی. در کشت قطعات کورتکس تخمدان با وجود رشد فولیکول‌های ابتدایی (۲۷ و ۲۸)، انتقال فولیکول‌ها به مرحله پیش از آنترال مهار شده و بلوغ فولیکول‌ها ناموفق است، به عنوان مثال Tang و همکاران در سال ۲۰۱۲ قطعات کورتکس تخمدان را به مدت ۲۲ روز کشت دادند؛ لیکن قطر فولیکول‌ها به بیش از ۹۰ میکرون نرسید (۲۴).

علی‌رغم رشد مناسب فولیکول‌ها قبل از مرحله آنترال در قطعات کورتکس تخمدانی، به منظور رشد بیشتر فولیکول‌ها، جداسازی فولیکول‌ها از کورتکس تخمدان ضروری است (۸). برای کشت فولیکول‌های جدا شده، دو حالت دو بعدی و سه بعدی درنظر گرفته می‌شود. Wandji و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند در کشت دو بعدی فولیکول‌های جداسازی شده، امکان چسبیدن فولیکول‌ها به کف ظرف کشت وجود دارد (۲۵). در مطالعه حاضر نیز ابتدا از روش کشت دو بعدی برای کشت فولیکول‌های تخمدانی استفاده شد (داده‌های گزارش نشده)؛ لیکن به دلیل چسبیدن فولیکول‌های تخمدانی به جداره داخلی ظروف و نیز به منظور حفظ ساختار آناتومیک فولیکول‌ها در طی رشد، از کشت سه‌بعدی استفاده گردید. در این روش، فولیکول‌ها مشابه شرایط طبیعی تخمدان، درون یک ماتریکس خارج سلولی کشت داده شده تا مورفولوژی کروی، اتصالات سلول- سلول و سلول- ماتریکس که برای تنظیم تکامل فولیکول ضروری هستند، حفظ شود (۱۴، ۱۷ و ۲۶) در همین زمینه بهترین نتایج رشد فولیکولی از کشت سه‌بعدی فولیکول‌ها به دست آمده است، به‌طوری که Sun و همکاران در سال ۲۰۱۳ فولیکول‌های اولیه (primary) گاوی را به مدت ۲۱ روز در سیستم کشت سه‌بعدی با کلاژن در حضور

www.SID.ir

Archive of SID

فاکتورهای رشد مختلف به ۲۲۰ میکرون رساندند؛ هرچند رشد آن‌ها پس از این مرحله متوقف شد (۱۳). Araújo و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ با کشت فولیکول‌های ثانویه در آلژینات در عرض یک ماه، موفق به رشد فولیکول‌های ۲۰۰ میکرونی به ۴۵۰ میکرونی شدند (۴).

تاکنون از ترکیبات متعددی به منظور رشد فولیکول‌های تخمدانی در محیط کشت فولیکول‌ها استفاده شده است. Araújo و همکاران در سال ۲۰۱۴ از BSA به‌منظور رشد فولیکول‌های جداشده گاوی استفاده کردند (۴) و یا Sun و همکاران در سال ۲۰۱۳ از FBS برای تکمیل محیط کشت بهره بردند (۲۲). در همین زمینه Hosseini و همکاران نیز دو نوع سرم (HSA و FBS) را برای کشت فولیکول‌های ابتدایی و اولیه جدا شده از تخمدان‌های انسانی با هم مقایسه کردند و نشان دادند تفاوت معنی‌داری در افزایش رشد فولیکول‌های کشت داده شده با FBS وجود دارد (۷). مشابه نتایج Hosseini و همکاران، در مطالعه حاضر نیز افزایش معنی‌داری در رشد فولیکول‌های ثانویه کوچک پس از ده روز کشت مشاهده شد که نشان می‌دهد ترکیبات موجود در FBS به طور مؤثری در رشد فولیکول‌های گاوی در آزمایشگاه نقش دارند.

تلاش‌هایی در زمینه حذف سرم از محیط کشت و جایگزین کردن آن با ترکیبات شناخته شده‌تر به دلیل مضرات احتمالی سرم صورت گرفته است؛ امّا نتایج رضایت بخشی به دست نیامده است (۱۶). در این راستا Spate و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند PS48 می‌تواند جایگزین BSA در کشت رویان‌های خوکی تولید شده در آزمایشگاه شود. این ترکیب قابلیت فسفریلاسیون Akt و مهار Foxo3 را دارد (۲۱). در مطالعه حاضر از PS48 به‌منظور کشت فولیکول‌های تخمدانی به جای سرم استفاده شد؛ لیکن برخلاف نتایج Spate و همکاران، جایگزینی PS48 با BSA یا FBS در رشد فولیکول‌ها تاثیر کمتری داشت، هرچند استفاده از این ترکیب به عنوان فعال کننده مسیر TPI3K/Akt در کنار FBS موجب افزایش معنی‌دار رشد فولیکول‌ها شده بود که تأییدی بر نتایج سایر مطالعات مبنی بر به‌کارگیری ترکیبات فعال کننده مسیر PI3K در بهبود شرایط رشد فولیکولی بود. به عنوان مثال Desai و همکاران در سال ۲۰۱۰ موفق به القای بلوغ فولیکول‌های ابتدایی در قطعات تخمدانی بیماران سرطانی شدند. آن‌ها قطعات تخمدانی را با مهارکننده ژن PTEN که منجر به فعال‌سازی مسیر PI3K می‌شود، تیمار کردند و به موش پیوند زدند. نتایج نشان داد مهار PTEN منجر به رشد فولیکول‌های ابتدایی به مرحله پیش از تخمک‌گذاری می‌شود (۸). McLaughlin و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ترکیب دی‌پتاسیم بیس‌پروکسو (۵-هیدروکسیپیریدین ۲-کربوکسیل) اکسووانادات (bpV) به عنوان مهار کننده مسیر PTEN و فعال کننده Akt به منظور بررسی فعال‌سازی، بقا و تکامل فولیکول‌های تخمدان انسانی در شرایط *in vitro* استفاده کردند. اگرچه مهار این مسیر منجر به افزایش شروع رشد فولیکول و تکامل فولیکول‌ها به مرحله ثانویه شد؛ امّا فولیکول‌های جدا شده و کشت داده شده رشد محدود و بقای کمی در مقایسه با گروه کنترل داشتند (۱۵). Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر MHY1485 را به عنوان فعال کننده مسیر mTOR (مسیر پایین دست PI3K/Akt)، بر تخمدان موش‌های جوان بررسی کردند. کشت تخمدان‌ها به مدت ۴ روز با MHY1485موجب افزایش وزن بافت تخمدان و تکامل فولیکول‌ها شد؛ همچنین استفاده هم‌زمان از MHY1485، bpV(hopic) و 740YP (فعال کننده مسیر PI3K) در محیط کشت تخمدان موش و سپس پیوند تخمدان سبب افزایش معنی‌دار در تعداد فولیکول‌های آنترال قبل از تخمک‌گذاری گردید (۷). اخیراً نتایجی مشابه نیز در مطالعه Sun و همکاران با bpV(hopic)، 740YP و فسفاتیدیک اسید و پروپرانولول به عنوان تحریک کننده مسیر mTOR

www.SID.ir

Archive of SID

(پایین دست مسیر PI3K) به دست آمده است (۲۳).

با توجه به آن‌که AKT در فعالیت‌های سلولی متعددی همچون متابولیسم، رشد، تکثیر، بقا، سنتز پروتئین، رونویسی و آپوپتوز نقش دارد (۱۰) و نیز مسیر پایین دست انتقال گلوکز از طریق گیرنده انسولین را به طور مثبت میانجی‌گری می‌کند (۲۰). احتمالاً افزایش اندازه فولیکول در گروه تیمار شده نسبت به گروه شاهد، در ارتباط با اثر تکثیری PS48 بر سلول‌های گرانولوزای فولیکول است، همچنین گزارش‌های متعددی مبنی بر اثرات مثبت AKT بر فاکتورهای رشد میانجی‌گر بقای سلول و اثرات مهاری آن بر آپوپتوز وجود دارد (۹ و ۲۰). در این زمینه Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۴ کاهش سطح آپوپتوز در سلول‌های اپی‌تلیال را با فعال شدن AKT از طریق مهار کاسپاز-۳ تأیید کردند (۲۹). Bommhardt و همکاران نیز در همان سال نشان دادند که بیان بیش از حد AKT در کاهش آپوپتوز لنفوسیت‌ها در موش‌های تراریخته مؤثر است (۵). باتوجه به موارد ذکر شده و با وجود فراهم نبودن شرایط بررسی وضعیت آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در مطالعه حاضر، اثرات مثبت PS48 بر تکامل فولیکول را شاید بتوان به‌طور غیرمستقیم به تأثیرات این مسیر بر مهار آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا نسبت داد.

نکته قابل توجه درمورد همه گروه‌ها، کاهش سرعت رشد پس از روز چهارم کشت است. در تخمدان، فولیکول‌های ابتدایی در قسمت قشر تخمدان قرار گرفته‌اند. با شروع رشد، مسیر Hippo در فولیکول‌ها غیرفعال و منجر به افزایش تکثیر سلول و رشد فولیکول‌ها می‌شود که این افزایش رشد موجب قرار گرفتن فولیکول‌ها در بخش مدولا می‌گردد. این مسأله خود مسیر ذکر شده را فعال می‌کند و در نهایت نیز سرعت رشد فولیکول‌ها را کاهش می‌دهد (۱۲). با توجه به قرارگیری فولیکول‌ها در آلژینات در مطالعه حاضر، احتمال تأثیر مسیر Hippo بر فولیکول‌ها کم است و احتمالاً کاهش سرعت رشد فولیکول‌ها در حین تکامل آن‌ها می‌تواند به علت ناکافی بودن ترکیبات محیط کشت و یا وجود مهارکننده‌هایی در محیط کشت باشد که منجر به توقف رشد و افزایش آپوپتوز می‌شود، هرچند تثبیت پیش فرض‌های ارایه شده نیاز به پژوهش‌های بیشتری در این زمینه دارد.

در پایان، مطالعه حاضر اولین مطالعه در زمینه بررسی اثرات فعال کننده مسیر سیگنالینگ Akt بر رشد فولیکول‌های ثانویه است و نشان دهنده اهمیت این مسیر بر رشد و تکامل فولیکول‌های تخمدانی و استفاده از سایر تحریک کننده‌های مسیر PI3K/Akt در رشد فولیکول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی است.

قدردانی و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از پژوهشکده فناوری جنین دام وابسته به دانشگاه شهرکرد به دلیل فراهم کردن امکان انجام این مطالعه، اعلام می‌دارند.

منابع

1- Aerts, J. M. and Flothman, BM-M, K; Quantification and viability assessment of isolated bovine primordial and primary ovarian follicles retrieved through a standardized biopsy collection of the bovine ovary. Reprod. Domest. anim.; 2008; 43: 360-366.

2- Alfonso Mora, D. K; Daan, M. F.; Van Aalten, D. and Alessi, R;. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. Seminar. Cell Develop. Biol.; 2004; 15(2): 161-170.

3- Araújo, V. R; Figueiredo, J. R. and Gastal, E. L; *In vitro* culture of bovine

www.SID.ir

Archive of SID

Endocrinol.; 2010; 8: 119-131.

9- Fernández, M; Sánchez-Franco, F; Palacios, N; Sánchez, I; Fernández, C. and Cacicedo, L; IGF-I inhibits apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in pituitary cells. Journal of Molecul. Endocriol.; 2004; 33(1): 155-163.

10- Hemmings, B. A. and Restuccia, D. F; PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012; 4: a011189.

11- Hosseini, L; Shirazi, A; Naderi, M. M; Boroujeni, S. B; Sarvari, A. and Sadeghnia S; Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. Rrproductive Biomedicine Online. 2017; 35(4) : 343-350.

12- Hsueh, A. J; Kawamura, K. and Cheng, Y; Intraovarian control of early folliculogenesis. Endocrin. Rev.; 2014; 36(1): 1-24.

13- Jing Sun, X. L; Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture *in vitro*. Reprod. Biol.; 2013; 13: 221-228.

14- Kreeger, P. K; Fernandes, N. N; Woodruff, T. K. and Shea, L. D; Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating preantral follicles. Reprod. Biol. Endocrinol.; 2014; 12: 78-94.

4- Araújo, V. R; Gastal, M. O; Wischral, A; Figueiredo, J. R. and Gastal, E. L; *In vitro* development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. Theriogenology; 2014; 82(9): 1246-1253.

5- Bommhard, U; Chang, K. C; Swanson, P. E; Wagner, T. H; Tinsley, K. W. and Karl, I. E; Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. J. Immunol.; 2004; 172 (12): 7583-7591.

6- Carlos, J. and Souza, EET; Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. Reprod. suppl.; 2003; 61: 429-443.

7- Cheng, Y; Kim, J.; Li, X. X. and Hsueh, A. J; Promotion of Ovarian Follicle Growth following mTOR Activation: Synergistic Effects of AKT Stimulators. PLOS one; 2015; 10(2): e0117769.

8- Desai, N; AbdelHafez, F; Calabro, A; Goldfarb, J; Fleischman, A. and Falcone, T; Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. Reprod. Biol.

www.SID.ir

Archive of SID

hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. Biol. Reprod.; 2005; 73(5): 942-950.

15- McLaughlin, M; Kinnell, H. L; Anderson, R. A. and Telfer E. E; Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary *in vitro* results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. Molecul. Hum. Reprod.; 2014; 20(8): 736-744.

16- McLaughlin, M. and Telfer, E. E; Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. Reproduction; 2010; 139: 971-978.

17- Pangas, S. A; Saudye, H; Shea, L. D. and Woodruff, T. K; Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes. Tissue eng.; 2003; 9(5): 1013-1021.

18- Reddy, P; Zheng, W. and Liu, K; Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. Trend. Endocrinol. Metabol.; 2009; 21(2): 96-103.

19- Rice, S; Ojha, K. and Mason, H; Human ovarian biopsies as a viable source of pre-antral follicles. Hum. Reprod.; 2008; 23(3): 600-605.

20- Shaw, T. J. and Vanderhyden, B. C; AKT mediates the pro-survival effects of KIT in ovarian cancer cells and is a determinant of sensitivity to imatinib mesylate. Gynecol. Oncol.; 2007; 105: 122-131.

21- Spate, Ld; Brown, A; Redel, B. k; Whitworth, K. M. and Prather, R. S; PS48 can replace bovine serum albumin in pig embryo culture medium, and improve *in vitro* embryo development by phosphorylating AKT. Molecul. Reprod. Develop.; 2015; 82: 315-320.

22- Sun, J. and Li, X; Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture *in vitro*. Reprod. Biol.; 2013; 13: 221-228.

23- Sun, X; Su, Y; He, Y; Zhang, J; Liu, W; Zhang, H; Hou, Z; Liu, J. and Li, J; New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. cell cycle. 2015; 14(5): 721-731.

24- Tang, K; Yang, W. C; Li, Xiang, L; Wu, C. J; Sang, L. and Yang, L. G; GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. Anim. Reprod. Sci.; 2012; 131: 129-134.

25- Wandji, S. J; Eppig, J. J. and Fortune J. E; FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro*

www.SID.ir

Archive of SID

of granulosa cells of bovine preantral follicles. Theriogenology; 1996; 45: 817-832.

26- West, E. R; Xu, M; Woodruff, T. K. and Shea, L. D; Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. Biomaterials; 2007; 28(30): 4439-4448.

27- Yang, M. and Fortune, J; Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. Molecul. Reprod. Develop.; 2007; 74(9): 1095-1104.

28- Yang, M. and Fortune, J; The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. Biol. Reprod.; 2008; 78(6): 1153-1161.

29- Zhang, H. M; Rao, J. N; Guo, X; Liu, L; Zou, T. and Turner, D. J; Akt kinase activation blocks apoptosis in intestinal epithelial cells by inhibiting caspase-3 after polyamine depletion. J. Biol. Chemist.; 2004; 279 (21): 22539-22547.

www.SID.ir

Archive of SID

Improving the growth of bovine isolated ovarian secondary follicles with Akt signaling pathway stimulation

Hemmatian Khayyat, S.[1]; Shirazi, A.[2,3,4*]; Shams-Esfandabadi, N.[5]; Mirzaie, S. A.[6], Nazari, H.[7]

1. PhD student, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Professor, Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran- Iran.
3. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
5. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
6. Associate Professor, Department of Genetics, Biotechnology and Molecular Medicine, Faculty of Medical Science, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
7. Assistant Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 11 July 2018 ***Accepted:*** 17 September 2018

Summary

In vitro ovarian follicle culture in females at the risk of losing fertility, such premature ovarian failure (POF) and in those subjected to chemo/radio therapy as well as in animals – species at risk of extinction in a promising strategy for fertility preservation. Development of ovarian growing follicles is regulated by the coordinated action of several signaling pathways. The use of some activators or inhibitors of signaling pathways is effective in optimizing the culture conditions of immature follicles. The aim of this study was examining *in vitro* growth of bovine ovarian secondary stage follicles (> 80 µm) by mimicking the process of *in vivo* follicular development through of the Akt signaling pathway activator, PS48. Small secondary stage follicles were isolated by enzymatic digestion from slaughter ovaries by collagenase type I and Dnase I, cultured in the presence of BSA (3 mg/ml), FBS (10%), Akt (5µM PS48, first 48 h of culture) or Akt + FBS (5µM PS48, first 48 h of culture + 10% FBS) for ten days and then evaluated for growth rate. The follicular size was significantly increased in all experimental groups during 10 days culture ($P<0.05$). In all groups, growth rate/day was higher in initial days of culture, after that follicular growth rate decreased. The highest growth rate was observed in FBS + PS48 group, while the lowest growth rate was detected in PS48. On the other hand, though the FBS supplemented group could increase the growth rate of follicles, its combination with PS48 was more effective. In conclusion, in our study condition the best result in follicular growth, was obtained when follicular culture medium was supplemented with FBS + PS48.

Keywords: Cattle, *In vitro* culture, Secondary Follicles, Akt signaling pathway, PS48.

* Corresponding Author E-mail: Shiraziabbas@yahoo.com

www.SID.ir