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

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 بهینه سازی شرایط کشت این دسته از فولیکول ها 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، تحریک مسیر سیگنالینگ Akt، با استفاده از PS48 به عنوان محرک این مسیر است. به‌همین 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 شدند. 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 تکمیل شده با FBS سرعت رشد فولیکول را افزایش دهد، در ترکیب با PS48 موثرتر بود. در نتیجه، در شرایط مطالعه 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. با شروع رشد، فولیکول‌های ابتدایی فعال شده و به فولیکول‌های

اولیه (primary)، ثانویه (secondary) و آنترال (antral) تکامل می‌یابند. تعداد فولیکول‌های تخمدان از همان ابتدای دوران جنینی تعیین می‌شود و تخلیه این مخزن فولیکولی منجر به پیری تولیدمثلی می‌شود (۱). کشت فولیکول به صورت *in vitro* علاوه بر درک مکانیسم‌های دخیل در فعال‌سازی فولیکول‌های ابتدایی و آشنایی با دینامیک فولیکولی (۲)، موجب بازگشت امید به حفظ باروری در دختران و زنان مبتلا به سرطان می‌شود که فرایند درمان را با موفقیت پشت سر گذاشته اند که با کمک تکنیک‌هایی نظیر انجماد و کشت بافت تخمدان قابل تحقق است (۳). پس از کشت بافت تخمدان و یا فولیکول‌های اخذ شده از بافت تخمدانی، تخمک‌های نابالغ حاصل از فولیکول‌های پری‌آنترال در تکنیک‌های کمک باروری (Assisted Reproductive Technology) همانند بلوغ آزمایشگاهی تخمک *به منظور* تولید رویان در انسان و در کنار آن تولید حیوانات کایمر و حفظ گونه‌های در معرض خطر انقراض در حیوان قابل استفاده‌اند (۱). در زمینه کشت فولیکول‌های تخمدانی، بزرگترین چالش انتخاب سیستم و محیط کشت مناسب به‌منظور بهبود رشد و تکامل فولیکول‌های مراحل مختلف است.

یکی از اصلی ترین مسیرهای تنظیم کننده توقف و یا رشد فولیکول های تخمدانی مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt است. مولکول میانجی این مسیر PDK1 است که می‌تواند Akt و برخی پروتئین کیناز ها نظیر S6K1 و SGK1 را فسفریله و فعال کند (۴). فسفریلاسیون Akt با سرکوب فعالیت رونویسی FOXO3 (FOXO3 رونویسی ژن های محرک آپوپتوز را افزایش می‌دهد) موجب فعال‌سازی فولیکول‌های ابتدایی می‌شود، همچنین Akt منجر به افزایش بقا و حیات سلول‌ها با مهار BAD که از اعضای خانواده BCL-2 است، می‌شود. از سویی دیگر Akt با غیرفعال کردن Tsc2 و تنظیم فعالیت mTORC1 رشد سلولی را بیشتر می‌کند. mTORC1 و PDK1، با فعال کردن S6K1 و SGK1 ترجمه پروتئین و سنتز ریبوزوم را در تخمک بهبود می‌دهند (۵). در مطالعات متعددی، بهبود تکامل فولیکول در شرایط آزمایشگاه به واسطه

افزودن مواد تحریک کننده مسیر PI3K و مهارکننده مسیر PTEN گزارش شده است. (Z)-5-(4-Chlorophenyl)-3-phenylpent-2-enoic acid (PS48) آگونیست آلوستریک PDK1 است که قادر به فعال‌سازی Akt است [۶].

هدف از مطالعه حاضر بررسی مسیر سیگنالینگ موثر در رشد و تکامل فولیکول های تخمدانی در پستانداران است، تا بتوان با تحریک مسیر سیگنالینگ Akt با PS48 که خود موجب مهار پروتئین FOXO3 (به عنوان مهارکننده فاکتورهای موثر در رشد و تکثیر سلول) می‌شود، موجب ابقا و تداوم رشد فولیکول‌های مراحل ثانویه کوچک تا مراحل بالاتر شد.

مواد و روش کار

تخمدان‌های گاوی از کشتارگاه جونقان در کمتر از ۲ ساعت در ترموفلاسک حاوی سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه منتقل و پس از شست و شو با الکل ۷۰٪ تا انجام مرحله بعد در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه-داری شدند.

به‌منظور تهیه قطعات تخمدانی، هر تخمدان از وسط دو نیم شده و سپس ناحیه‌ی مدولا حذف و کورتکس با تیغ اسکالپل تا رسیدن به قشر 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 Dnase I و ۱۲۴۰ واحد کلاژناز نوع I منتقل شد و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده 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 حاصله ۵ میلی‌لیتر H-TCM سرد حاوی PVA (۳ml/mg) و

BSA (۴ml/mg) اضافه شد (۷). در نهایت فولیکول‌های ثانویه کوچک (<۸۰ میکرومتر) زیر لوپ با بزرگنمایی ۹۰، جدا و در محیط H-TCM حاوی ۱۰٪ سرم دسته بندی و سه بار 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 ۳بعدی 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 گرفته 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 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 داده 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 نرم افزار Image J 1.46r اندازه گیری شد و داده‌های حاصل از رشد فولیکولی پس از ۵ بار تکرار با طرح آزمایشی بلوک کاملا تصادفی با داده‌های چندمشاهده ای و آزمون تکمیلی دانکن با نرم افزار Statistical Analysis System (SAS) ویرایش و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

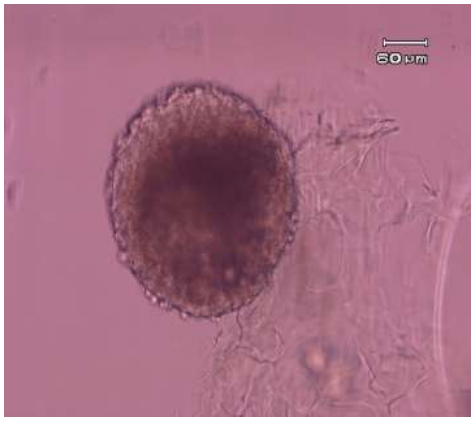
نتایج

پس از ده روز کشت فولیکول‌های ثانویه ، رشد در تمام گروه‌ها مشاهده شد. هر چه به روز ۱۰ نزدیک تر می‌شد، سرعت رشد فولیکول‌ها کاهش پیدا می‌کرد. بین تمام گروه‌ها به جز 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.

جدول ۱- رشد 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	۱۰۳/۶±۳/۱۵۵^{A,b}	۱۱۱/۳±۳/۱۵۵^{B,b}	۱۳۳/۱±۳/۱۵۵^{C,b}	۱۴۹/۲±۳/۱۵۵^{D,b}
۴	۱۱۳/۳±۳/۱۵۵^{A,c}	۱۲۰/۷±۳/۱۵۵^{B,c}	۱۷۴/۱±۳/۱۵۵^{C,c}	۱۸۹/۲±۳/۱۵۵^{D,c}
۶	۱۱۹/۶±۳/۱۵۵^{A,c,d}	۱۲۸/۹±۳/۱۵۵^{B,c,d}	۲۰۹/۲±۳/۱۵۵^{C,d}	۲۱۹±۳/۱۵۵^{D,d}
۸	۱۲۴/۸±۳/۱۵۵^{A,d,e}	۱۳۵±۳/۱۵۵^{B,d,e}	۲۳۵/۱±۳/۱۵۵^{C,e}	۲۴۶/۱±۳/۱۵۵^{D,e}
۱۰	۱۲۹/۸±۳/۱۵۵^{A,e}	۱۳۹/۸±۳/۱۵۵^{B,e}	۲۴۵/۱±۳/۱۵۵^{C,f}	۲۵۱±۳/۱۵۵^{D,e}

[a-f] حروف نامتشابه کوچک در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی دار است (P<۰/۰۵). [A-D] حروف نامتشابه بزرگ در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار است (P<۰/۰۵). اعداد براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.



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 (۹, ۱۰)، 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 داده لیکن قطر فولیکول‌ها به بیش از ۹۰ میکرون نرسید (۱۱). علی‌رغم رشد مناسب فولیکول‌ها قبل از مرحله آنترال در قطعات کورتکس تخمدانی لیکن برای ادامه رشد و بلوغ فولیکول‌ها، جداسازی فولیکول‌ها از کورتکس تخمدان ضروری است (۱۲) 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 دوبعدی فولیکول‌های جداسازی شده، امکان چسبیدن فولیکول‌ها به کف ظرف کشت وجود دارد (۱۳). در مطالعه حاضر نیز ابتدا از روش کشت دوبعدی 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 (۱۴-۱۶) 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 فاکتورهای رشد مختلف به ۲۲۰ میکرون رساندند؛ هرچند رشد آن‌ها پس از این مرحله متوقف شد (۱۷). 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 (۱۸).

تاکنون از ترکیبات متعددی به منظور رشد فولیکول های تخمدانی در محیط کشت فولیکول‌ها استفاده شده است. Araújo و همکاران در سال ۲۰۱۴ از BSA به‌منظور رشد فولیکول‌های جداشده گاوی استفاده کردند (۱۹)؛ و یا Sun و همکاران در سال ۲۰۱۳ از FBS برای تکمیل محیط کشت بهره بردند (۲۰). در همین زمینه Hosseini و همکاران نیز دو نوع سرم (HSA و FBS) را جهت کشت فولیکول‌های ابتدایی و اولیه جداشده از تخمدان‌های انسانی با هم مقایسه کردند و نشان دادند تفاوت معنی‌داری در افزایش رشد فولیکول‌های کشت داده شده با FBS وجود دارد (۲۱).. 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 دارد.

تاکنون تلاش‌هایی در زمینه حذف سرم از محیط کشت و جایگزین کردن آن با ترکیبات شناخته شده تر به دلیل مضرات احتمالی سرم صورت گرفته است؛ اما تاکنون نتایج رضایت بخشی به دست نیامده است (۲۲). 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 (۸). 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 در موجب افزایش معنی‌دار رشد فولیکول‌ها شده بود که تأییدی بر نتایج سایر مطالعاتی مبنی بر به‌کار گیری ترکیبات فعال کننده مسیر PI3K در بهبود شرایط رشد فولیکولی بود. به عنوان مثال Li 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 (۱۲). در سال ۲۰۱۴، McLaughlin و همکاران از ترکیب dipotassium bisperoxo (5-hydroxypyridine-2-carboxyl) oxovanadate (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؛ اما فولیکول‌های جدا شده و کشت داده شده رشد محدود و بقای کمی در مقایسه با گروه کنترل داشتند (۱۹). Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر MHY1485 را به‌عنوان فعال کننده مسیر mTOR (مسیر پایین دست PI3K/Akt)، بر تخمدان موش‌های جوان بررسی کردند. کشت تخمدان‌ها به مدت ۴ روز با MHY1485 موجب 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 (۲۳). اخیراً نتایجی مشابه نیز در مطالعه Sun و همکاران با (bpV(hopic، 740YP و فسفاتیدیک اسید و پروپرانولول به عنوان تحریک کننده مسیر mTOR (پایین دست مسیر PI3K) به دست آمده است (۲۴).

با توجه به آن‌که AKT در فعالیت های سلولی متعددی همچون متابولیسم، رشد، تکثیر، بقا، سنتز پروتئین، رونویسی و آپوپتوز نقش دارد (۲۵) و نیز مسیر پایین دست انتقال گلوکز از طریق گیرنده انسولین را به طور مثبت میانجی‌گری می‌کند (۲۶)؛ 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 (۲۶, ۲۷). 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 (۲۸). Bommhardt و همکاران نیز در همان سال نشان دادند که بیان بیش از حد AKT در کاهش آپوپتوز لنفوسیت‌ها در موش‌های تراریخته مؤثر است (۲۹). باتوجه به موارد ذکر شده و باوجود فراهم نبودن شرایط بررسی وضعیت آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در مطالعه حاضر، اثرات مثبت PS48 بر تکامل فولیکول را شاید بتوان به‌طور غیر مستقیم 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 گیری فولیکول‌ها در بخش مدولا می‌گردد. این مسأله خود مسیر ذکر شده را فعال می‌کند و در نهایت نیز سرعت رشد فولیکول‌ها را کاهش می‌دهد (۳۰). 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 فرض های ارائه 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 بوده 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.

تشکر و قدردانی

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 می دارند.

منابع:

1- Araújo VR, M.O.G, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro culture of bovine preantral follicles. Reproductive Biology and Endocrinology. 2014;12:78-94.
2- JM Aerts BM-M, K Flothman. Quantification and viability assessment of isolated bovine primordial and primary ovarian follicles retrieved through a standardized biopsy collection of the bovine ovary. reroduction of domestic animals. 2008;43:360-6.
3- Carlos J Souza EET. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. reproduction supplement. 2003;61:429-43.
4 -Alfonso Mora DK, Daan M.F. van Aalten, Dario R. Alessi, . PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2004;15(2):161-70.
5 -Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2009;21(2):96-103.
6 -Rice S, Ojha3 K, Helen Mason1. Human ovarian biopsies as a viable source of pre-antral follicles. Human Reproduction. 2008;23(3):600-5.

7 -Hosseini L, Shirazi A, Naderi MM, Boroujeni SB, Sarvari A, Sadeghnia S, et al. Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. Rrproductive Biomedicine Online. 2017;In Press.
8 -SPATE LD, BROWN A, REDEL BK, WHITWORTH KM, PRATHER RS. PS48 Can Replace Bovine Serum Albumin in Pig Embryo Culture Medium, and Improve In vitro Embryo Development by Phosphorylating AKT. Molecular Reproduction & Development. 2015;82:315-20.
9 -Yang M, Fortune J. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. Molecular reproduction and development. 2007;74(9):1095-104.
10- Yang M, 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. Biology of reproduction. 2008;78(6):1153-61.
11- KeQiong Tang W-CY, Xiang Li, Can-Jie Wu, Lei Sang, Li-Guo Yang∗. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. Animal Reproduction Science. 2012;131:129-34.
12- Nina Desai AA, Faten AbdelHafez, Anthony Calabro, James Goldfarb, Aaron Fleischman,, Falcone T. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. Reproductive Biology and Endocrinology. 2010;8:119-31.
13 -S.-A. Wandji JJEaJEF. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. theriogenology. 1996;45:817-32.
14 -Pangas SA, Saudye H, Shea LD, Woodruff TK. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes. Tissue engineering. 2003;9(5):1013-21.
15- West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. Biomaterials. 2007;28(30):4439-48.
16- Kreeger PK, Fernandes NN, Woodruff TK, Shea LD. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. Biology of reproduction. 2005;73(5):942-50.
17 -Jing Sun XL. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. reproductive biology 2013;13:221-8.
18- Araújo VR, Gastal MO, Wischral A, Figueiredo JR, Gastal EL. 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.
19- McLaughlin M, Kinnell HL, Anderson RA, Telfer EE. 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. Molecular Human Reproduction. 2014;20(8):736-44.
20 - Sun J, Li X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. Reproductive BIology. 2013;13:221-8.
21- Cheng Y, Kim J, Li XX, Hsueh AJ. Promotion of Ovarian Follicle Growth following mTOR Activation: Synergistic Effects of AKT Stimulators. PLOS one. 2015;10(2):e0117769.
22- McLaughlin M, Telfer EE. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. reproduction. 2010;139:971-8.
23- Yuan Cheng JK, Xiao Xiao Li, and Aaron J. Hsueh. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators. PLoS One. 2015;10(2):e0117769. PubMed PMID: 25710488. Pubmed Central PMCID: 4340052.
24- Xinhui Sun YS, Yuanlin He, Jing Zhanga, Wenwen Liua, Huilin Zhangb, Zheng HoucJiayin Liuc , Jing Lia. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. cell cycle. 2015;14(5):721-31.

25- Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012;4:a011189.
26- Shaw TJ, Vanderhyden BC. AKT mediates the pro-survival effects of KIT in ovarian cancer cells and is a determinant of sensitivity to imatinib mesylate. Gynecologic Oncology 2007;105:122-31.
27- Fernández M, Sánchez-Franco F, Palacios N, Sánchez I, C CF, L. LC. IGF-I inhibits apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in pituitary cells. Journal of Molecular Endocriology. 2004;33(1):155-63.
28- Zhang HM, Rao JN, Guo X, Liu L, Zou T, Turner DJ, et al. Akt Kinase Activation Blocks Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells by Inhibiting Caspase-3 after Polyamine Depletion. The Journal of Biological Chemistry. 2004;279(21):22539-47.
29- Bommhard U, Chang KC, Swanson PE, Wagner TH, Tinsley KW, Karl IE, et al. Akt Decreases Lymphocyte Apoptosis and Improves Survival in Sepsis. The Journal of Immunology. 2004;172(12):7583-91.
30- Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y. Intraovarian control of early folliculogenesis. Endocrine Reviews. 2014;36(1):1-24.

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

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