فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۹ ص. ۸-۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی بر سطوح هورمون‌های استرادیول و تستوسترون مترشحه از سلول‌های گرانولوزای تخمدان موش نابالغ نژاد NMRI

سجاد فرخ یار[۱]، جواد بهارآرا[۲*]، اکرم عیدی[۳]، نسیم حیاتی رودباری[۳]

[۱] گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه،واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[۳] گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه،واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] Email: baharara78@gmail.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۹

چکیده

امروزه مشکل ناباروری در دنیا به صورت یک نگرانی اجتماعی درآمده است و می‌تواند ضربه روانی شدیدی به زوجین وارد سازد. از مهمترین سلول‌های تخمدان، سلول‌های گرانولوزا می باشند که رشد و بلوغ اووسیت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. اگزوزوم ها یک کلاس ویژه از وزیکول‌های خارج سلولی می‌باشند که می‌توانند با سیگنال رسانی به سلول‌ها باعث بروز پاسخ‌های سلولی شوند. هدف از این پژوهش تجربی بررسی ترشح هورمون‌های استرادیول و تستوسترون در سلول‌های گرانولوزای تحت تیمار با اگزوزوم های مترشحه از سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌باشد. در این پژوهش سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی کشت داده شدند و محیط کشت رویی سلول‌ها که حاوی اگزوزوم بودند جمع‌آوری گردید. درادامه با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی، میکروسکوپ الکترونی نگاره حضور و قطر اگزوزوم ها بررسی شد. در نهایت غلظت هورمون‌های مترشحه از سلول‌های گرانولوزا با روش الیزا بررسی شد. نتایج بدست آمده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی و نگاره حضور اگزوزوم‌ها با قطر تقریبی ۷۰ نانومتر را تایید کردند و همچنین تیمار سلول‌های گرانولوزای تخمدان موش کوچک آزمایشگاهی با اگزوزوم‌های بدست آمده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی موجب افزایش ترشح هورمون‌های استرادیول و تستوسترون توسط این سلول‌ها شد. نتایج بدست آمده از این مطالعه موید تاثیر اگزوزوم‌های مشتق شده از مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی بر ترشح هورمون‌های جنسی استرودیول و تستوسترون است.

کلیدواژه‌ها: سلول های بنیادی، اگزوزوم، سلول گرانولوزا، استرودیول، تستوسترون.

مقدمه

امروزه مشکل ناباروری در دنیا به‌صورت یک نگرانی اجتماعی درآمده است و می‌تواند ضربه روانی شدیدی به زوجین وارد سازد[۵]. ناباروری عدم توانایی زوج‌ها در باردارشدن پس از یک سال مقاربت جنسی و بدون استفاده از روش‌های پیشگیری گفته می‌شود و می‌تواند عواقب جسمانی و روانی همراه با هزینه‌های مالی زیاد برای درمان این افراد را در برگیرد[۱۸]. فعال کردن روند تقسیم میوز در اووسیت و بلوغ آن از اهداف مهم درماني محققین علوم ناباروری بوده است[۹]. بلوغ آزمایشگاهي اووسیت‌ها (In Vitro Maturation, IVM) برای اولین بار در سال ۱۹۳۵ توسط Pincus Enzman مطرح گردید [۹]. امروزه القا رشد و تکامل اووسیت در خارج از بدن یکي از روش‌هایی است که در فنّاوری کمکي تولیدمثل به کار گرفته می‌شود [۶]. در پستانداران، درطي فاز فولیکولار چندین فولیکول شروع به رشد کرده و فقط یکي از آن‌ها و یا تعداد محدودی از آن‌ها شانس تبدیل‌شدن به اووسیت بالغ را پیدا می‌کنند و بقیه چند روز قبل از تخمک‌گذاری دچار آترزی شده و در آن‌ها آپوپتوزیس صورت می‌گیرد. درروش IVM اووسیت‌ها در مرحله وزیکول ژرمینال از تخمدان برداشته شده و در محیط In vitro کشت داده می‌شوند، سپس تخمک‌های بالغ مرحله متافاز II توسط اسپرم بارور می‌شوند[۱۵]. سلول‌های گرانولوزا مهم‌ترین سلول‌های تخمدان می‌باشند که تغییرات فیزیولوژیکی و موفولوژیکی در طی فرایندهای فولیکولار که شامل تکثیر، تمایز، تخمک‌گذاری و لوتئالاسیون و آترزی است را متحمل می‌شوند که رشد و بلوغ اووسیت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند، عملکرد اصلی سلول های گرانولوزا شامل القاء تولید هورمون های جنسی و پپتیدهای مختلف مورد نیاز برای فولیکولوژنز و تخمک‌گذاری می‌باشد[۱]. اگزوزوم‌ها یک کلاس ویژه از وزیکول های خارج سلولی می‌باشند که منشاء غشایی دارند و توسط بسیاری از سلول‌ها ترشح می‌شوند[۷]. اگزوزوم‌ها محموله‌ی پیچیده‌ای از مواد را شامل microRNA، mRNA، RNA غیر رمز شونده‌ی بلند و DNA ژنومیک از سلول‌های دهنده به سلول‌های گیرنده تحویل می‌هند که به‌عنوان مکانیسمی از ارتباطات سلول با سلول می‌باشد[۴]. آنالیز بر روی اگزوزوم مشخص کرده است که تمام اگزوزوم‌ها در برخی از شاخص‌ها از جمله ساختار (دو لایه لیپیدی)، اندازه، تراکم و ترکیب پروتئینی مشترک هستند[۸]. تحقیقات نشان داده‌اند که اگزوزوم ها به عنوان یک وسیله‌ی نقلیه و یا ارتباطی برای تنظیم فعالیت‌های پروسه‌های سلولی عمل می‌کنند که از سایر سلول‌های دیگر ترشح می‌شوند [۸]. ثابت شده است که اگزوزوم‌های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی بافت آسیب دیده را بهبود می‌بخشند و همچنین پاسخ‌های ایمنی را تنظیم می‌کنند[۲]. این اثرات با توجه به ویژگی و ارسال سیگنال‌های پاراکرینی حاصل می‌شود[۱۲]. امروزه کشت آزمایشگاهي تخمك یکی از مؤثرترین روش‌ها در درمان اختلالات باروري بوده و گامي مؤثر جهت کمك به زنان براي حفظ باروري در بیماری‌های تهدیدکننده باروري و یا درمان‌های رژیمي همچون شیمی درمانی می‌باشد[۱۳]. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در جهت یافتن عواملی که رشد و تمایز فولیکول‌های کشت داده شده در محیط آزمایشگاهی را بهبود بخشد در حال انجام است که در این زمینه استفاده از ترکیبات محرک رشد در بلوغ آزمایشگاهی تخمک توجهات زیادی را جلب نموده است.

در دهه گذشته علاقمندی‌های زیادی در زمینه مطالعه عملکردهای اگزوزوم‌ها به عنوان ابزارهای مهم ارتباطات سلول- سلول در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و آسیب شناختی صورت گرفته که از نظر تکاملی حفاظت شده هستند و شواهد زیادی وجود دارند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به شیوه پاراکراین عمل می‌نمایند و این می‌تواند تاکید بر عوامل زیستی موجود در مورد کشت شرایطی آنها باشد همچنین مواد مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمی دارای عملکردهای مشابه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند و این عملکرد شامل ترمیم آسیب بافتی، حمایت از پاسخ‌های التهابی و تعدیل سیستم ایمنی است[۲۱]. از این رو بر آن شدیم تا اثرات اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی را بر سلول‌های گرانولوزای موش کوچک آزمایشگاهی را بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

تهیه اگزوزوم‌ها

تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان:

یک سر موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI که در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) در اتاقک حیوانات نگهداری شد، به وسیله‌ی کلروفورم کشته و استخوان ران آن جدا گردید. سپس دو سر استخوان قطع شده و به وسیله‌ی یک سرنگ که از محیط کشت پر شده محتویات مغز استخوان به درون فلاسک کشت سلولی منتقل شد. پس از چند بار تعویض محیط کشت و حذف مواد زاید، سلول های بنیادی مغز استخوان شروع به تکثیر و خالص شدن کردند.

شناسایی سلول‌های بنیادی با روش فلوسایتومتری

جهت شناسایی سلول‌های بنیادی از مارکر سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی CD 44 و CD 45 و روش فلوسایتومتری استفاده گردید.

جداسازی و خالص سازی اگزوزوم

محیط‌کشت روی سلول‌ها زمانی که آن‌ها به تراکم حدود ۷۰ الی ۸۰ درصد از فلاسک رسیدند، حذف سپس به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در محیط کشت فاقد سرم (FBS بدون اگزوزوم) کشت داده شد. مایع رویی جمع‌آوری شد و اگزوزوم ها با اولتراسانتریفیوژ در g ۱۰۰/۰۰۰ خالص سازی شدند. اگزوزوم ها در µl ۲۰۰ از PBS معلق شده (suspended) و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد (°C) نگهداری شدند.

شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (Atomic Force Microscope)

برای آماده سازی جهت میکروسکوپی نیروی اتمی، نمونه‌ها در دستگاه سونیکاتور برای مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از خروج از دستگاه سونیکاتور مقدار ۳ میکرولیتر از نمونه‌ها برداشت شد و با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول پارافرمالدئید ۲% که از قبل طبق پروتوکل موجود تهیه شده است بلافاصله فیکس شدند. سپس یک قطره ی کوچک روی لام قرار داده شدو پس از حدود ۱۵ دقیقه و بعد از خشک شدن نمونه ها بررسی توسط میکروسکوپ نیروی اتمی صورت گرفت.

شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

به منظور بررسی شکل و اندازه اگزوزوم‌های تخلیص شده توسط گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد تثبیت و با PBS شستشو شد. سپس نمونه توسط اتانول آبگیری شده و روی سطح شیشه ای خشک با لایه‌ی نازکی از طلا پوشانده شد و توسط میکروسکوپ بررسی گردید.

تعیین غلظت اگزوزوم‌ها

به‌جهت تعیین غلظت اگزوزم‌ها از روش بردفورد استفاده گردید. به منظور تعیین مقدار اگزوزوم جدا شده، پروتئین آن را با استفاده از محلول Bradford و رسم نمودار استاندارد با استفاده ار رقت‌های متوالی شده از پروتئین BSA با غلظت مشخص تعیین گردید.

بررسی اثرات اگزوزوم‌ها بر سلول‌های گرانولوزا

حیوانات: موش‌های ماده کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI با سن تقریبی ۱۴تا۲۱ روز از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی - تکوین جانوری مشهد- ایران تهیه شد.

استخراج سلول‌های گرانولوزا: سلول‌های گرانولوزا با روش مکانیکی از فولیکول‌های تخمدان موش ۲۱ روزه استخراج و در محیط‌کشت αMEM حاوی FBS ,ITS و FSH قرار گرفتند و پس از گذشت ۴ روز سلول‌های گرانولوزا با دوزهای مختلف اگزوزوم‌ها تیمار شدند.

گروه‌های آزمون

گروه کنترل: سلول‌های گرانولوزا در محیط‌کشت پایه قرار گرفتند. تعداد ۱۰۵× ۵ سلول در هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه کشت داده شدند.

گروه تجربی ۱و ۲و ۳: سلول‌های گرانولوزا در محیط‌کشت پایه و غلظت‌های (۲۵و۵۰ و۱۰۰) میکرولیتر اگزوزوم ها قرار گرفتند. تعداد ۱۰۵× ۵ سلول در هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد.

تاثیر اگزوزوم‌ها بر ترشح هورمون تستوسترون و استرادیول در سلول‌های گرانولوزا

سلول‌های گرانولوزا با تراکم ۱۰۵× ۵ در هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه با CO_2 ۵% کشت شده و سپس سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت همراه اگزوزوم‌ها انکوبه شدند، محیط‌کشت رویی جمع‌آوری شده و سطوح استرادیول و تستوسترون در مایع رویی با استفاده از روش الایزا ارزیابی گردید.

یافته‌ها

تایید بنیادی بودن سلول‌های کشت‌شده با روش فلوسایتومتری

با توجه به اینکه سلول‌های بنیادی دارای مارکرهای اختصاصی می‌باشند حضور این مارکرها با تکنیک فلوسایتومتری بررسی شد. در این مطالعه مارکر CD44 و CD45 مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر زیر موید بیان و حضور این مارکرها بر سطح سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی می‌باشد.

نتایج حاصل از میکروسکوپ نیروی اتمی اگزوزوم‌ها

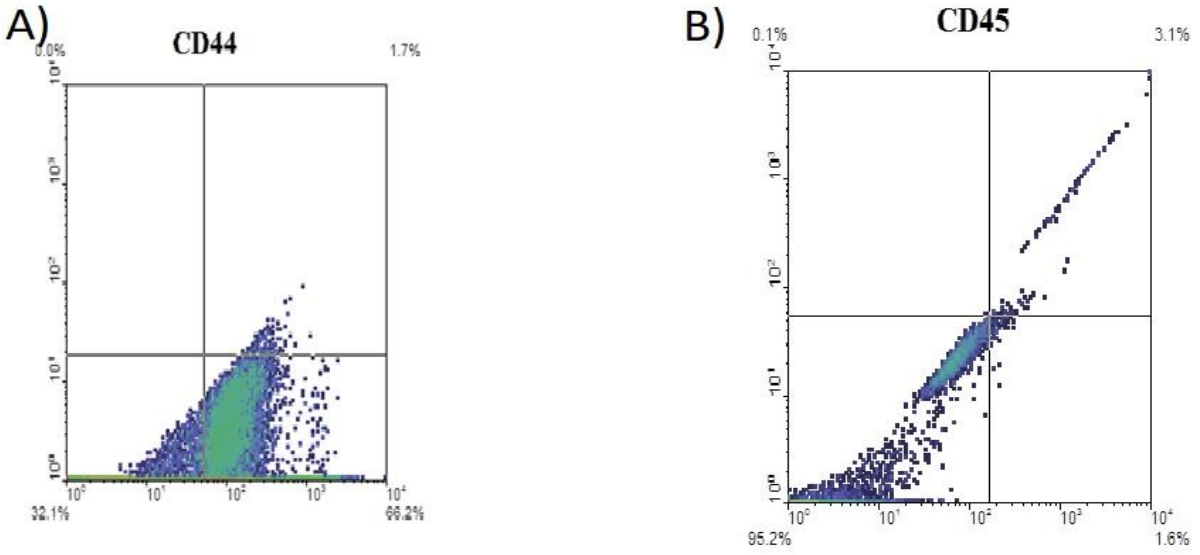
با توجه به نتایج منتشر شده در بسیاری از مقالات اندازه‌ی میانگین قطر اگزوزوم‌ها در حدود ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر می‌باشد. تصاویر زیر حاصل از میکروسکوپی نیروی اتمی بیانگر حضور اگزوزوم‌ها با دیامتر تقریبی بین ۲۰ تا ۱۶۰ نانومتر می‌باشد.

نتایج میکروسکوپ الکترونی

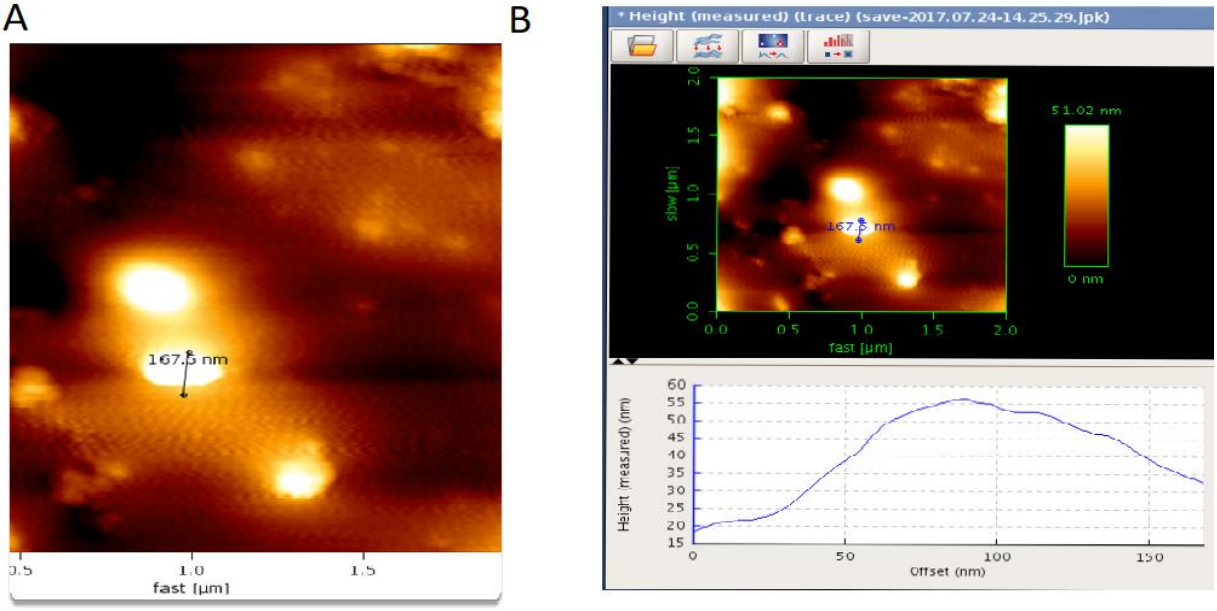
نمونه‌ی حاوی اگزوزوم برای انجام میکروسکوپی الکترونی نگاره (SEM) آماده شدند. تصاویر زیر موید حضور اگزوزوم ها با دیامتر تقریبی ۵۰ نانومتر می‌باشند.

نتایج بررسی اثر اگزوزوم‌ها بر ترشح هورمون استرادیول بر سلول‌های گرانولوزا

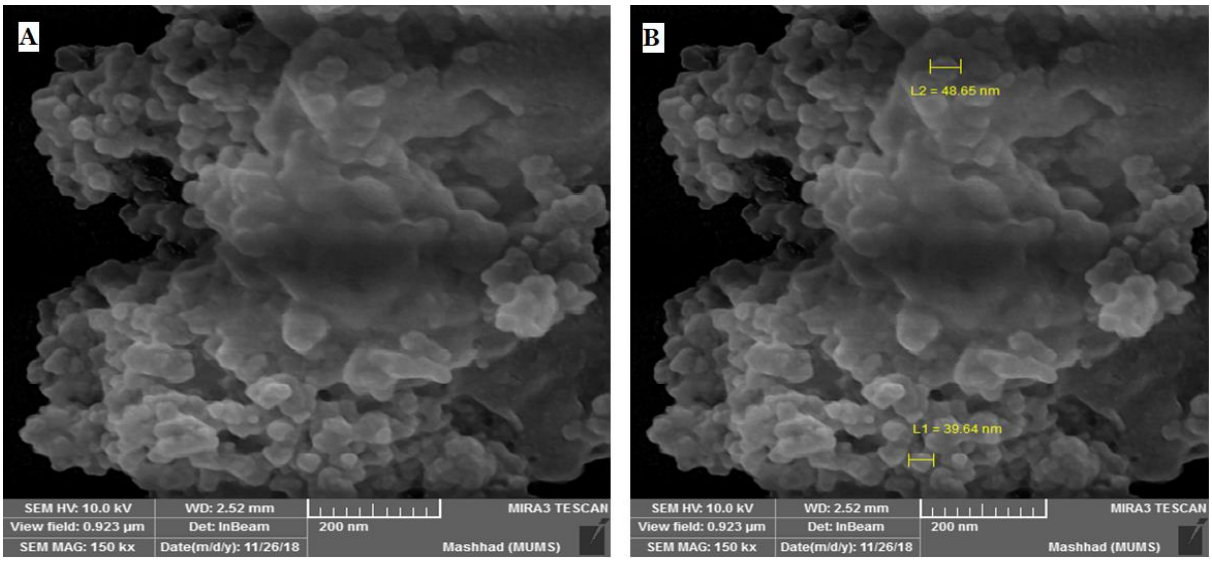
بعد از کشت سلول‌های گرانولوزا و جمع‌آوری محیط رویی غلظت هورمون استرادیول در محیط رویی با استفاده از کیت اختصاصی استرادیول و روش الایزا سنجیده شد. نتایج در نمودار زیر خلاصه شده‌اند.



A) نمودار مارکر سطحی CD44. همان طور که مشاهده می شود در حدود ۳۳% سلول ها مارکر CD44 را بیان نموده‌اند. B) نمودار مارکر سطحی CD45. بالغ بر ۹۵% سلول ها مارکر CD45را بیان نموه اند.



A) تصویر حاصل از میکروسکوپی نیروی اتمی. اگزوزومی را با دیامتر ۱۶۷ نانومتر نشان می دهد. B) نمودار خروجی میکروسکوپ نیروی اتمی که میانگین اندازه ی اگزوزوم ها را بین ۵۰ تا ۱۶۰ نانومتر نشان می دهد.



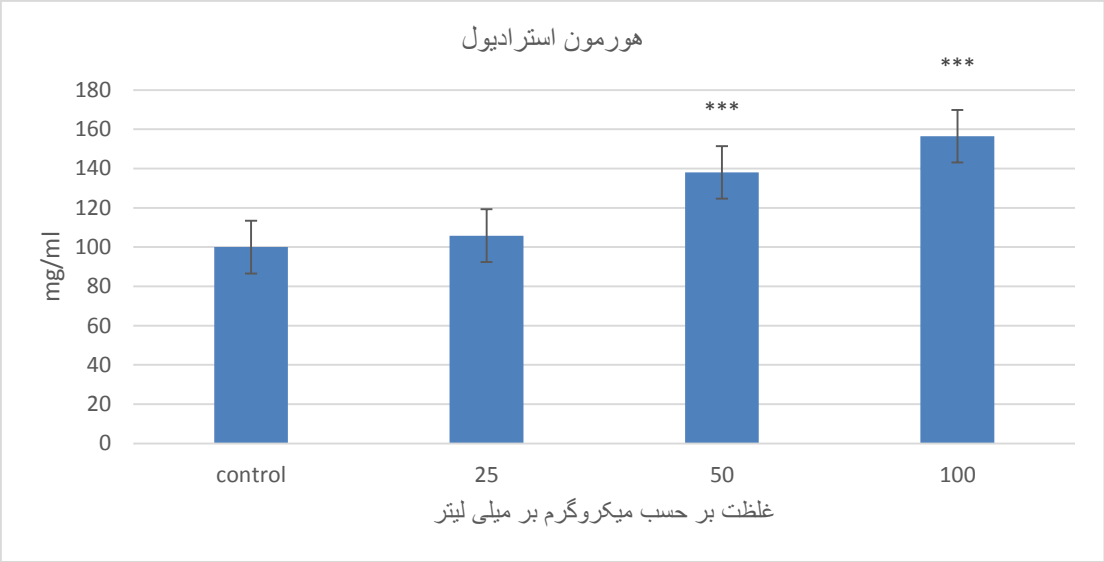
A) تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره که نشان دهنده ی توده ی متشکل از اگزوزوم ها می باشد. B) همان تصویر که ابعاد تقریبی اگزوزوم در آن مشخص شده است.

نتایج بررسی اثر اگزوزوم‌ها بر ترشح هورمون تستوسترون سلول‌های گرانولوزا

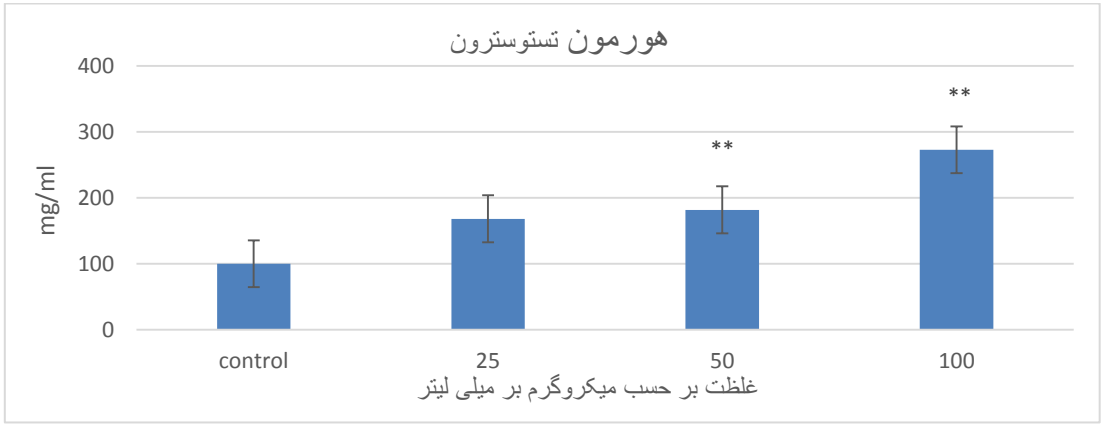
بعد از کشت سلول‌های گرانولوزا و جمع‌آوری محیط رویی غلظت هورمون تستوسترون در محیط رویی با استفاده از کیت اختصاصی تستوسترون و روش الایزا سنجیده شد. نتایج در نمودار زیر خلاصه شده اند.

بحث

در تحقیقات نشان داده شده است که سلول‌ها علاوه بر ترشح فاکتورهای محلول، نانو وزیکول‌هایی به نام اگزوزوم تولید می‌کنند که از طریق آن‌ها با سلول‌های مجاور و دورتر ارتباط برقرار می‌کنند[۷]. اگزوزوم‌ها دارای مقدار قابل توجهی از مولکول‌های پروتئین و RNA می‌باشند[۴]. در



نمودار غلظت هورمون استرادیول مترشحه از سلول‌های گرانولوزای تحت تیمار با اگزوزوم های استخراج شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش بر اساس تکنیک الایزا. ***: p-value=0.0001



نمودار غلظت هورمون تستوسترون مترشحه از سلول‌های گرانولوزای تحت تیمار با اگزوزوم های استخراج شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش بر اساس تکنیک الایزا. **: p-value=0.004

Maumus مطالعه حاضر اگزوزوم‌ها از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده وعکس‌برداری از آنها انجام گرفت. در پژوهش خود در سال ۲۰۱۳ نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی تعمیر بافت آسیب دیده را بهبود می‌بخشند و همچنین پاسخ‌های ایمنی را تنظیم می‌کنند و این اثرات با توجه به ویژگی و ارسال سیگنال‌های پاراکرینی حاصل می شود[۱۲]. این سلول‌ها در بسیاری از فرآیندهای فیزولوژیکی و پاتولوژیکی دخیل‌اند چون حمل کننده‌ی ذراتی هستند که فاکتورهای درمانی نامیده می‌شوند و آنها را به محل آسیب می‌رسانند[۲]. اگزوزوم‌ها وزیکول‌هایی با اندازه ۳۰ تا ۲۰۰ نانومتر هستند که در پردازش‌های پاتولوژیکی و بیولوژیکی نقش اساسی دارند و بسته به این که از چه سلول‌هایی منشا می‌گیرند دارای ترکیبات مختلف هستند، لذا بیان ژن های متفاوتی را تنظیم می کنند[۱۹]. در پژوهش حاضر نیز بر اساس یافته های میکروسکوپی اتمی و نگاره اگزوزوم‌های بدست آمده نیز تقریبا دارای قطر ۷۰ نانومتر بودند که هم راستا با نتایج دیگر پژوهش‌ها می‌باشد. همچنین اگزوزوم‌ها در پردازش‌های متفاوت زیستی مانند ایمنی، التهاب، بارداری، تعمیم بافت، انعقاد خونی و رگزایی نقش دارند [۱۱]. از مزایای مهم اگزوزوم‌ها این است که می‌توان آن‌ها را

مهندسی کرد و ترکیبات مختلف را داخل آن‌ها جا داد و نیز اختصاصیت آن‌ها را با انتقال گیرنده های اختصاصی اگزوزومی بالا برد[۱۱]. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در جهت یافتن عواملی که رشد و تمایز فولیکول‌های کشت داده‌شده در محیط آزمایشگاهی را بهبود بخشد در حال انجام است که در این زمینه استفاده از ترکیبات محرک رشد در بلوغ آزمایشگاهی تخمک توجهات زیادی را جلب نموده است[۲۳]. به عنوان مثال اینترلوکین ۱ (IL-1) تکثیر سلول‌های گرانولوزای گاو و رت را در شرایط In Vitro تنظیم می‌کند همچنین IL-1 تکثیر سلول‌های تخمدانی را تحریک می‌کند و آپوپتوز و رشد فولیکولی را نیز سرکوب می‌کند[۱٤]. مچنین IL-1 بتا برای سنتز و تنظیم استروئید و تخمک گذاری در رت‌ها در سلول‌های گرانولوزا و تکا عمل می‌کند[۲۲]. این سیتوکاین همچنین GVBD را در تخمدان خرگوش بهبود می‌بخشد و تحریک کننده میوز و بلوغ اووسیت در اسب ماده می‌باشد[۱۶].

در سال ۲۰۱۶ Sarvar و همکاران بیان داشتند که که اگزوزوم‌ها واسطه‌های بیولژیکی هستند که تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک ایجاد می‌شوند که شامل mRNAs, siRNA، لیپیدها، RNAsهای ریبوزومی هستند، در حقیقت مشخص شده است عملکردهای آن‌ها مشابه عملکرد سلول‌های مزانشیمی دارای عملکرد حمایتی می‌باشند و در ترمیم آسیب‌های بافتی، سرکوب پاسخ‌های التهابی می‌شوند و دارای فاکتورهای ترمیمی بافت می‌باشند[۱۷]. FSH تولید استرادیول را تحریک می‌کند، و محققان گزارش دادند وقتی بطور طبیعی مرحله فولیکول آنترال در داخل بدن ایجاد می‌شود، تأثیر قابل توجهی در میوز تخمک دارد، FSH به نظر می‌رسد تکثیر سلول گرانولوزا را تحریک می‌کند، در حالی که استرادیول اندازه سلول را افزایش می‌دهد[۳]. براساس نتایج مطالعات قبلی، استرادیول می‌تواند بر رشد فولیکول پره آنترال تأثیر مثبت بگذارد[۱۰]. در این مطالعه، درصد ترشح استرادیول در سلول‌های گرانولوزا تحت تیمار با اگزوزوم نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. نتایج این بخش نشان داد که اگزوزوم با غلظت مناسب اثرات مثبتی بر ترشح هورمون استرادیول در سلول‌های گرانولوزا دارد.

تغییرات در تستوسترون، در مطالعات داخل بدن و آزمایشگاهی نشان داد که تستوسترون باعث تبدیل فولیکول‌های اولیه به ثانویه می‌شود، این هورمون همچنین باعث افزایش تکثیر تک و گرانولوز می‌شود و باعث کاهش شاخص آپوپتوز در فولیکول‌های آنترال می‌شود[۲۰]. در این مطالعه، تولید تستوسترون در سلول های گرانولوزا تحت تیمار با اگزوزوم، مقایسه شد، نتایج ترشح تستوسترون در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد که در گروههای تحت تیمار با اگزوزوم، غلظت تستوسترون در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافت،

نتایج بدست آمده ازتحقیق حاضر موید این موضوع است که می‌توان از اگزوزوم‌ها برای افزایش میزان باروری استفاده کرد. جنبه ی حایز اهمیت این تحقیق این است که برای اولین بار از مواد زاید و دور ریختنی در طی فرآیند کشت سلول‌های بنیادی ماده‌ایی استخراج شده است که دارای طیف وسیعی از عملکردهای متفاوت و موثر بر سلول‌های گرانولوزا می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری که در انجام این مطالعه نقش بسزایی را ایفا نمودند نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

[1] Abedal-Majed, M. A., Romereim, S., Davis, J. S., & Cupp, A. S. 2019. Perturbations in Lineage Specification of Granulosa and Theca Cells May Alter Corpus Luteum Formation and Function. Frontiers in Endocrinology, 10, 832

[2] Fierabracci, A., Del Fattore, A., Luciano, R., Muraca, M., Teti, A., & Muraca, M. 2015. Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles. Cell Transplantation, 24(2): 133-149.

[3] Fortune, J. E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Animal reproduction science, *78*(3-4): 135-163

[4] Hannafon, B. N., & Ding, W. Q. 2013. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. International journal of molecular sciences, 14(7): 14240-14269.

[5] Jonaidy, E., Noorani Sadodin, S., Mokhber, N., & Shakeri, M. T. 2009, Comparing the marital satisfaction in infertile and fertile women referred to the public clinics in Mashhad in 2006-07, The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility, 12(1): 7-16.

[6] Karami Shabankareh, H., Sarsaifi, K., & Mehrannia, T. 2011. In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum. Journal of assisted reproduction and genetics, 28(6): 531-537.

[7] Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Pasterkamp, G. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem cell research, 4(3): 214-222.

[8] Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., & Lim, S. K. 2015. Mesenchymal stem cell exosomes. In Seminars in cell & developmental biology, 40: 82-88.

[9] Leibfried, M. L., & Bavister, B. D. 1983. Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters. Journal of Experimental Zoology, 226(3): 481-485.

[10] Mao, J., Wu, G., Smith, M. F., McCauley, T. C., Cantley, T. C., Prather, R. S., ... & Day, B. N. 2002. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. Biology of reproduction, 67(4): 1197-1203.

[11] Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. Journal of proteomics, 73(10): 1907-1920.

[12] Maumus, M., Jorgensen, C., & Noel, D. 2013. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. Biochimie, 95(12): 2229-2234.

[13] Najafabadi, M. E., Malekshah, A. K., Moghaddam, A. E., Hamidabadi, H. G., & Heidari, M. 2014. Effect of embryonic fibroblast cells conditioned medium on in vitro maturation of immature mouse oocytes. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 23(1): 107-114

[14] Passos, J. R. S., Costa, J. J. N., da Cunha, E. V., Silva, A. W. B., Ribeiro, R. P., de Souza, G. B., ... & Van Den Hurk, R. 2016. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1β on primordial follicle activation and survival in vitro. Domestic animal endocrinology, 54: 48-59.

[15] Roberts, R., Franks, S., & Hardy, K. 2002. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. Human Reproduction, 17(11): 2950-2956.

[16] Roy, S. K., & Greenwald, G. S. 1991. Mediation of follicle-stimulating hormone action on follicular deoxyribonucleic acid synthesis by epidermal growth factor. Endocrinology, *129*(4): 1903-1908.

[17] Sarvar, D. P., Shamsasenjan, K., & Akbarzadehlaleh, P. 2016. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: new opportunity in cell-free therapy. Advanced pharmaceutical bulletin, *6*(3): 293.

[18] Sayehmiri, F., Bakhtiyari, S., Darvishi, P., & Sayehmiri, K. 2013, Prevalence of gestational diabetes mellitus in Iran: a systematic review and meta-analysis study. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility, 15(40): 16-23.

[19] Sun, L. I., Xu, R., Sun, X., Duan, Y., Han, Y., Zhao, Y., ... & Xu, W. 2016. Safety evaluation of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cell. Cytotherapy, *18*(3): 413-422.

[20] Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. Reproduction, *139*(4): 685.

[21] Vrijsen, K. R., Sluijter, J. P. G., Schuchardt, M. W. L., Van Balkom, B. W. M., Noort, W. A., Chamuleau, S. A. J., & Doevendans, P. A. F. M. 2010. Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. Journal of cellular and molecular medicine, 14(5): 1064-1070.

[22] Yu, Y., Li, W., Han, Z., Luo, M., Chang, Z., & Tan, J. 2003. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. Theriogenology, *60*(9): 1691-1704.

[23] Zeringer, E., Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. V. 2015. Strategies for isolation of exosomes. Cold Spring Harbor Protocols, 2015(4): pdb-top074476.

The effect of exosomes derived from bone marrow stem cells on the levels of estradiol and testosterone secreted from the ovarian granulosa cells of immature NMRI mice

Farrokhyar S.[1], Baharara J.[2*], Eidi A.[3], Hayati Rodbari N.[3]

[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Biology and Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
[3] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email: baharara78@gmail.com

Received: October 2020 Accepted: December 2020

Abstract

The problem of infertility in the world today has become a social concern and can cause severe psychological trauma to couples. One of the most important ovarian cells are granulosa cells that affect the growth and maturation of oocytes. Exosomes are a special class of extracellular vesicles that can trigger cellular responses by signaling to cells. The aim of this experimental study was to evaluate the secretion of estradiol and testosterone in granulosa cells treated with exosomes secreted from bone marrow stem cells. In this study, bone marrow stem cells were cultured and the culture medium of cells containing exosomes was collected. Subsequently, the presence and diameter of exosomes were examined using atomic force microscopy and electron microscopy. Finally, the concentration of hormones secreted from granulosa cells was assessed by ELISA method. The results obtained by atomic force microscopy and electron microscopy confirmed the presence of exosomes with an approximate diameter of 70 nm and also treatment of mice ovarian granulosa cells with exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells increased the secretion of estradiol and testosterone by these cells. The results of this study confirm the effect of exosomes derived from the bone marrow of NMRI mice on the secretion of the sex hormones estradiol and testosterone.

Keywords: Stem cells, Exosome, Granulosa cell, Estradiol, Testosterone.