



## Effect of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells on maturation of preantral follicles of immature NMRI mice

Farrokhyar S<sup>a</sup>, Baharara J<sup>b\*</sup>, Eidi A<sup>a</sup>, Hayati Rudbari N<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran

<sup>b</sup>Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad

<sup>a</sup>Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran, Email: baharara@mshdiau.ac.ir

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Farrokhyar S, Baharara J, Eidi Aa, Hayati Rudbari N, Effect of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells on maturation of preantral follicles of immature NMRI mice. Journal of Cell and Tissue . 2023;13(4):311-323.

<https://10.52547/JCT/13.4.311>

### KEYWORDS

Bone marrow stem cells  
Exosome, Folliculogenesis enes,  
Preantral follicle

### ABSTRACT

**Aim:** Infertility is a life crisis that affects patients worldwide. Infertility is defined as failure to conceive after 12 months of sexual activity, affecting 15-17% of couples worldwide. and about 50% of them are related to the factors of female infertility. Activating the process of meiosis in the oocyte and its maturation has been one of the important therapeutic goals of infertility researchers. Today, inducing oocyte growth and development outside the body is one of the methods used in assisted reproduction technology. Bone marrow is a complex organ in which different lineages of hematopoietic and stromal cells support hematopoiesis. Extracellular vesicles (EVs) with a size of 20-100 nm are released by different types of cells in culture media. In addition to proteins, exosomes are enriched with an array of cytokines, specific lipid rafts such as phosphoglyceride, cholesterol, ceramide, fatty-acyl chains, as well as mRNAs, miRNAs, non-coding RNAs, tRNAs, rRNAs, and rarely DNA.

The purpose of this experimental research is to investigate the effect of exosomes derived from the bone marrow stem cells of small laboratory mice on the maturation of preantral follicles. **Material and methods:** Exosomes were isolated and cultured from the mesenchymal stem cells of the bone marrow of small laboratory mice by the flushing method. Identification of stem cells was done by flow cytometry method and separation and purification of exosomes was done by ultracentrifuge, identification of exosome was also checked by atomic force microscope (AFM). The effects of exosomes on the viability of follicles were measured by the MTT method, and developmental parameters such as the diameter and the formation of the antrum cavity in the follicles were examined and the follicles were examined on days 0, 2, 3 and 4 of culture with 20 magnification and inverted microscope. Photographs were taken and the diameter of the follicles was measured in micrometers by Image J software. The expression of GDF-9, BMP-15 and BMP-7 genes as genes involved in the growth and maturation of follicles was investigated using Real

\* Corresponding author. Tel.:0513847092; Fax: 05138437092

E-mail address: Baharara78@gmail.com

DOI: <https://10.52547/JCT/13.4.311>

Received: Sep 1, 2022; Received in revised form: Dec 1, 2022; Accepted: Dec 7, 2022

Original Article

© Author



Time-PCR method. GraphPad Prism 8 software and one way Anova statistical test were used to analyze the data of this research.

**Results:** The evaluation of the viability of the follicles showed that compared to the control group, the follicles treated with exosome 25, 50 and 100 micrograms/ml showed an increase in viability, as well as the rate of antrum formation increased significantly in the group with the concentration 100 µg/ml showed a significant level ( $p < 0.01^{**}$ ) compared to the control group. The diameter of the follicles increased with increasing the concentration of exosomes compared to the control group. GDF-9, BPM-15 and BMP-7 genes also increased in the treatment groups.

**Conclusion:** According to the findings of this experimental research, it can be stated that exosomes derived from bone marrow stem cells Small laboratory mice have a positive effect on survival and maturity, as well as the growth of ovarian follicles.



## بررسی اثر اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی بر بلوغ فولیکول‌های پره آنترال نابالغ نژاد NMRI

سجاد فرخ یار<sup>۱</sup>، جواد بهارآرا<sup>۲\*</sup>، اکرم عیدی<sup>۳</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، sajadfarrokhyar@gmail.com

<sup>۲</sup> گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران، Baharara78@gmail.com

<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، Akram\_eidi@yahoo.com

<sup>۴</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، Nasimhayati@yahoo.com

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> ناباروری یک بحران زندگی است که بیماران را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می دهد، ناباروری به عنوان عدم موفقیت در بارداری پس از ۱۲ ماه فعالیت جنسی تعریف می شود که ۱۵ تا ۱۷ درصد از زوج ها را در جهان تحت تاثیر قرار می دهد و حدود ۵۰ درصد از آنها به عوامل ناباروری زنان مربوط می شود. فعال کردن روند تقسیم میوز در اووسیت و بلوغ آن از اهداف مهم درمانی محققین علوم ناباروری بوده است. امروزه القا رشد و تکامل اووسیت در خارج از بدن یکی از روش هایی است که در فتآوری کمکی تولیدمثل به کار گرفته می شود. مغز استخوان اندام پیچیده ای است که در آن دودمان های مختلف سلول های خونساز و استرومایی از خون سازی حمایت می کنند. وزیکول های خارج سلولی (EVs) که دارای اندازه ۲۰-۱۰۰ نانومتر می باشند توسط انواع سلول های مختلف در محیط های کشت آزاد می شوند. علاوه بر پروتئین ها، اگزوزوم ها با مجموعه ای از سیتوکین ها، قایق های لیپیدی خاص مانند فسفوگلیسرید، کلسترول، سرامید، زنجیره های چربی-آسیل و همچنین mRNAها، miRNAها، RNAهای غیر کدکننده، tRNAها، rRNAها و به ندرت DNA غنی می شوند هدف از انجام این پژوهش تجربی بررسی تاثیر اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی بر بلوغ فولیکول های پره آنترال می باشد.</p> <p><b>مواد و روش ها:</b> اگزوزوم ها از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی به روش فلاشینگ جداسازی و کشت داده شدند. شناسایی سلول های بنیادی با روش فلوسایتومتری انجام و جداسازی و خالص سازی اگزوزوم ها به وسیله الترا سانتریفیوژ انجام شد، شناسایی اگزوزوم نیز توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) بررسی گردید. اثرات اگزوزوم ها بر زیستایی فولیکول ها با روش MTT مورد سنجش قرار گرفت و همپنین پارامترهای تکوینی از جمله قطر و تشکیل حفره آنتروم در فولیکول ها بررسی و از فولیکول ها در روز های صفر، دوم، سوم و چهارم کشت با بزرگنمایی ۲۰ و با میکروسکوپ معکوس عکس برداری و قطر فولیکول ها توسط نرم افزار Image J بر حسب میکرومتر اندازه گیری شد.</p>	<p>اگزوزوم، سلول های بنیادی مغز استخوان، زن های فولیکوژنز فولیکول پره آنترال</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۰</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۹/۱۰</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۶</p>

بیان ژنهای GDF-9 و BMP-15 و BMP-7 به عنوان ژن‌های دخیل در رشد و بلوغ فولیکولها با استفاده از روش Real Time-PCR بررسی شد. جهت آنالیز داده‌های این پژوهش از نرم افزار 8 GraphPad Prism و تست آماری one way Anova استفاده شد. **نتایج:** ارزیابی زیستایی فولیکول‌ها نشان داد در مقایسه با گروه شاهد، فولیکول‌های تحت تیمار با آگروزوم ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزایش زنده ماندن را نشان می‌دهند، همچنین میزان تشکیل آنتروم افزایش معنی دار در گروه با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در سطح معنا داری ( $p < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل نشان داد. قطر فولیکول‌ها با افزایش غلظت آگروزوم‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. ژن‌های GDF-9 و BMP-15 و BMP-7 نیز در گروه‌های تیماری افزایش بیان داشته است. **نتیجه گیری:** با توجه به یافته‌های این پژوهش تجربی می‌توان می‌توان بیان نمود که آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی دارای اثر مثبت بر زیستایی و بلوغ و همچنین رشد فولیکول‌های تخمدانی می‌باشند.

## ۱- مقدمه

ناباروری اغلب یک بیماری خاموش است ناباروری یک بحران زندگی است که بیماران را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱). ناباروری به‌عنوان عدم موفقیت در بارداری پس از ۱۲ ماه فعالیت جنسی تعریف می‌شود که ۱۵ تا ۱۷ درصد از زوجها را در جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد و حدود ۵۰ درصد از آن‌ها به عوامل ناباروری زنان مربوط می‌شود (۲). فعال کردن روند تقسیم میوز در اووسیت و بلوغ آن از اهداف مهم درمانی محققین علوم ناباروری بوده است. بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها (In Vitro Maturation, IVM) برای اولین بار در سال ۱۹۳۵ توسط Pincus and Enzman مطرح شد (۳). امروزه القای رشد و تکامل اووسیت در خارج از بدن یکی از روش‌هایی است که در فناوری کمکی تولیدمثل به‌کار گرفته می‌شود (۳). مغز استخوان اندام پیچیده‌ای است که در آن دودمان‌های مختلف سلول‌های خونساز و استرومایی از خون‌سازی حمایت می‌کنند (۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (یا استرومایی) (MSCs) زیرجمعیتی از سلول‌های تمایز نیافته را با ویژگی‌های بارز خود نوسازی و تمایز نشان می‌دهند که این جمعیت برای اولین بار در دهه ۱۹۶۰ به‌عنوان سلول‌های استخوان ساز توصیف شد (۴). یکی از گسترده‌ترین موارد بررسی شده با خواص و پتانسیل کاربرد بالینی که هنوز ناشناخته است تعریف مناسب MSCها می‌باشد (۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ابتدا به‌عنوان زیر گروهی از سلول‌های دارای پتانسیل استخوان‌زایی شناسایی شدند، سپس به‌عنوان بازیگران اساسی در فرآیند خون‌سازی معرفی شدند (۶). مطالعات بر روی خواص بیولوژیکی و کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ۵ سال گذشته به‌طور گسترده انجام شده است، از جمله تلاش‌هایی برای تعریف این جمعیت سلولی با استفاده از نشانگرهای مناسب و استفاده گسترده از مدل‌های حیوانی. امروزه، فوریت بهینه‌سازی پروتکل‌ها برای کاربردهای بالینی از طریق تلاش مشترک پزشکان و دانشمندان آزمایشگاهی وجود دارد.

وزیکول‌های خارج سلولی (Extracellular vesicles) (یک اصطلاح کلی برای انواع مختلف اجزای غشایی در قطر ۲۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر است که توسط انواع سلول‌های مختلف در محیط‌های کشت آزاد شده شامل سلول‌های بنیادی، لنفوسیت‌های B و T، سلول‌های دندربیتی، ماست سل‌ها، سلول‌های چربی، سلول‌های عصبی، پلاکت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و اپی‌تلیال (۷)). علاوه بر این، EVها از بسیاری از مایعات بدن مانند ادرار، سرم، مایع آمنیوتیک، بزاق، مایع مغزی نخاعی، شیر مادر و ترشحات بینی جدا شده اند (۸). آگروزوم‌ها دارای چگالی شناور ۱/۱۰-۱/۲۱ گرم در میلی‌لیتر در یک گرادیان ساکارز هستند که می‌تواند با سانتریفیوژ با نیروی  $100.000 \times g$  رسوب کند (۸). علاوه بر پروتئین‌ها، آگروزوم‌ها با مجموعه‌ای از سیتوکین‌ها، قایق‌های لیپیدی خاص مانند فسفوگلیسرید، کلسترول، سرامید، زنجیره‌های چربی-آسیل و همچنین mRNAها، miRNAها،

RNAهای غیر کدکننده، tRNA، rRNA و به ندرت DNA غنی می‌شوند (۹). سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترمیم بافت‌های آسیب دیده و همچنین تعدیل پاسخ‌های ایمنی را بهبود می‌بخشد. این اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور گسترده توسط تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سیگنال‌های پاراکرین و چندین مولکول ترشح شده مانند میکروویکول‌ها انجام می‌شود (۱۰).

در مطالعه‌ی حاضر اثر اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی بر بلوغ فولیکول‌های تخمدان موش کوچک آزمایشگاهی بررسی شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

**تهیه اگزوزوم‌ها جهت تیمار فولیکول‌ها:** برای اجرای این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی (که بخشی از طرح با کد مصوب اخلاق به شماره IR.IAU.MSHD.REC.1398.194 می‌باشد) ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی به‌روش فلاشینگ جداسازی و کشت داده شدند. شناسایی سلول‌های بنیادی با روش فلوسایتومتری انجام شد (۳). جداسازی و خالص‌سازی اگزوزوم‌ها به‌وسیله الترا سانتریفیوژ انجام شد، شناسایی اگزوزوم نیز توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (Atomic Force Microscope) انجام شد (۳).

**تعیین غلظت اگزوزوم‌ها:** به جهت تعیین غلظت اگزوزوم‌ها از روش بردفورد استفاده شد. به‌منظور تعیین مقدار اگزوزوم جدا شده، پروتئین آن‌را با استفاده از محلول Bradford و رسم نمودار استاندارد با استفاده از رقت‌های متوالی شده از پروتئین BSA (Bovine Serum Albumin) با غلظت مشخص تعیین شد (۳).

**بررسی اثرات اگزوزوم‌ها بر فولیکول‌ها:** حیوانات: موش‌های ماده کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI با سن تقریبی ۱۴ تا ۲۱ روز از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی - تکوین جانوری مشهد- ایران تهیه شد.

ابتدا تخمدان‌ها از بدن موش‌های نابالغ نژاد NMRI خارج و پس از مجزا کردن بافت چربی و مزانتز در محیط کشت  $\alpha$ -MEM توسط استرئومیکروسکوپ، به‌روش مکانیکی به جداسازی فولیکول‌ها پرداخته شد (۱۱). سپس به‌صورت تصادفی در ۴ گروه شامل: گروه کنترل (بدون هیچگونه تیمار در شرایط طبیعی) گروه ۱ (گروه‌های تیمار با غلظت ۲۵ میکرولیتر اگزوزوم) گروه ۲ (گروه تیمار با غلظت ۵۰ میکرولیتر اگزوزوم) گروه ۳ (گروه غلظت ۱۰۰ میکرولیتر اگزوزوم) تقسیم بندی شدند. فولیکول‌های جدا شده در محیط کشت کامل حاوی محیط کشت (MEM -  $\alpha$ )، سرم جنین گاوی (FBS) (Jibco Germany) و محلول (FSH (Sinal F, Iran

(Insulin-Transferrin-Selenium) ITS (Jibco, Germany) ، و آنتی بیوتیک (Paa, Germany) به‌مدت ۱۲ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد  $CO_2$  کشت داده شدند (۱۱) و سپس ارزیابی تعداد فولیکول‌های زنده، قطر فولیکول‌ها و حفره آنتروم، و آنالیز سطح بیان ژن‌های BMP15 و GDF9 و bmp7 انجام شد.

**بررسی فولیکول‌های کشت شده:** از فولیکول‌ها در روزهای صفر، دوم، سوم و چهارم کشت با بزرگ‌نمایی ۲۰ و با میکروسکوپ معکوس عکس‌برداری شد و قطر فولیکول‌ها توسط نرم افزار Image J بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شد و در نهایت عواملی همچون میزان رشد فولیکول‌ها و درصد بقای فولیکول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

**القای تخمک‌گذاری:** در روز دوازدهم کشت به‌منظور القای تخمک‌گذاری، محیط کشت پایه با محیط کشت حاوی ۵/۱

IU/ml HCG تعویض شد و تا ۴۸ ساعت بعد، میزان بلوغ تخمک‌های اووله شده بررسی شد. در پایان این مرحله تعداد و درصد تکوین تخمک بررسی و ثبت شد

**بررسی تغییرات بیان ژن‌های BMP-15، GDF-9 و BMP-7 توسط Real Time-PCR در فولیکول‌ها:** پس از گذشت چهل و هشت ساعت از تیمار فولیکول‌ها با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم، بیان BMP-15، BMP-7 و به‌عنوان ژن‌های موثر در فرآیند فولیکولوژنز با تکنیک Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

GDF-9 Forward	5' CCAGCAACCAGGTGACAGGAC3'
GDF-9 Reverse	5' AGTGGAGGAGGAAGAGGCAGAG3'
BMP15 Forward	5' TGCTGACGACCCTACATTGC3'
BMP15 Reverse	5' CAGCCTCACCATTTTCGCTC3'
Actin Forward	5'TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC3'
Actin Reverse	5' CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC3'
BMP7 Forward	5' TTACTTTAGAGCCCTAGTCTG 3'
BMP7 Reverse	5' TATGGGTACATCGGTCCAAC 3'

RNA کل از گروه‌های تیمار شده و تیمار نشده طبق دستورالعمل سازنده (Scientific Thermo Fisher) استخراج شد. cDNA با کیت سنتز cDNA (پارس توس، ایران) ساخته شد. تکنیک Real Time PCR با استفاده دستگاه ریل تایم پی سی آر (BIORAD CFX 96 U.S.A.) انجام شد (۱۲). در این تکنیک از رنگ فلورسنت سایبرگرین (پارس توس، ایران) استفاده شد.

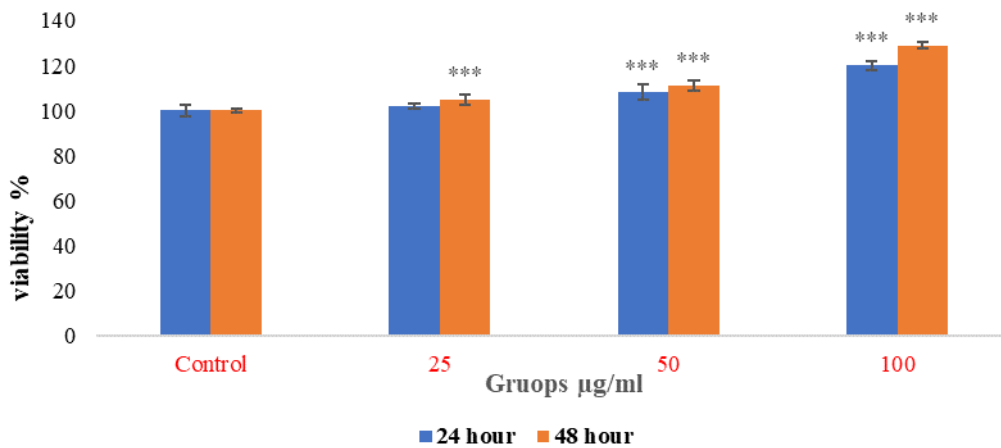
### ۳- آنالیز آماری

جهت آنالیز داده‌های این پژوهش از نرم افزار GraphPad Prism 8 و تست آماری one way Anova استفاده شد. کلیه نمودارها هم با استفاده از نرم افزار Excel رسم شده است.

### ۴- نتایج

#### اثر اگزوزوم بر زیستایی فولیکول‌ها

ارزیابی زیستایی فولیکول‌ها نشان داد در مقایسه با گروه شاهد، فولیکول‌های تحت تیمار با اگزوزوم ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزایش زنده ماندن را نشان می‌دهند و سلول‌هایی که تحت تیمار با اگزوزوم ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده‌اند، بیشترین افزایش زیستایی را برخوردار شده بودند (نمودار ۱)



نمودار ۱: اثر آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در تنظیم زیستایی فولیکول‌ها با استفاده از روش MTT. فولیکول‌ها با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آگزوزوم به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. ( $P < 0.001$ \*\*\*).

### نتایج بررسی قطر فولیکول‌ها

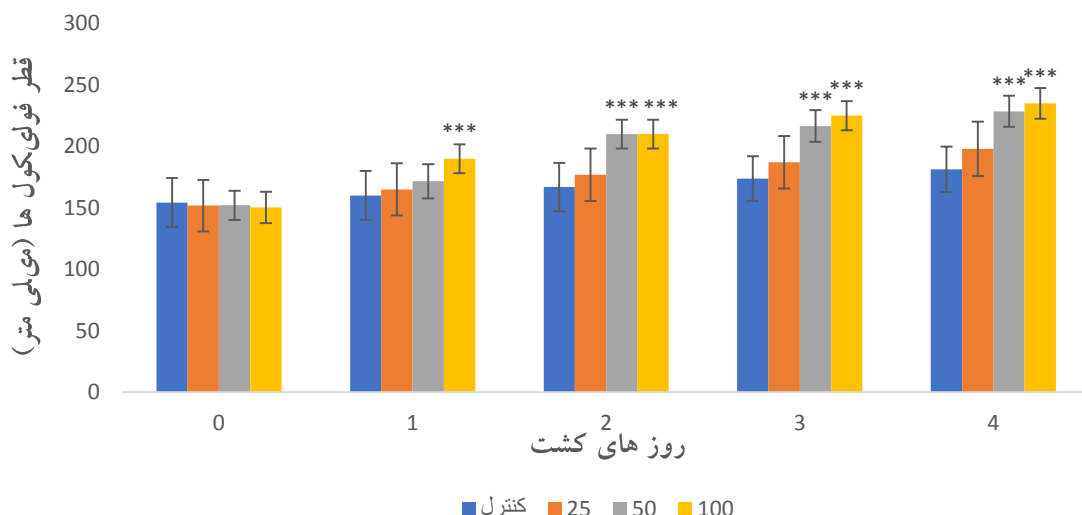
قطر فولیکول‌ها به مدت ۴ روز در گروه‌های کنترل و گروه با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم و گروه با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم و گروه با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم بررسی و اندازه‌گیری شد.

در روز یک کشت افزایش معنی‌داری ( $p < 0.001$ \*\*\*) در قطر فولیکول‌ها در گروه تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل همان روز مشاهده شد.

در روز دوم کشت افزایش معنی‌داری ( $p < 0.001$ \*\*\*) در قطر فولیکول‌ها در گروه تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل همان روز و در گروه تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل همان روز مشاهده شد.

همچنین نتایج مربوط به روز سوم کشت افزایش معنی‌داری ( $p < 0.001$ \*\*\*) در قطر فولیکول‌ها در گروه تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل همان روز و در گروه تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل همان روز را نشان دادند.

نتایج مربوط به روز چهارم کشت افزایش معنی‌داری ( $p < 0.001$ \*\*\*) در قطر فولیکول‌ها در گروه تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل همان روز و در گروه تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل همان روز را نشان دادند (نمودار ۲).



نمودار ۲: اثر غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر قطر فولیکول‌ها در روزهای ۰ تا ۴ نسبت به گروه کنترل (میلی‌متر)  $p\text{-value} < 0.001$  =\*\*\*

### نتایج ایجاد آنتروم در فولیکول‌ها

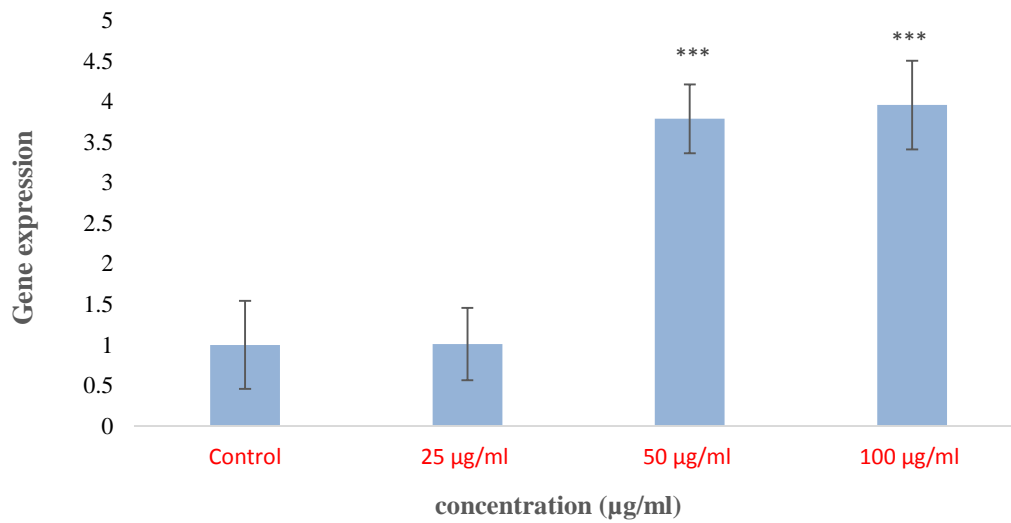
میزان تشکیل آنتروم در گروه با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر  $(9/82 \pm 19/37)$ ، گروه با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر  $(6/0 \pm 0.2/85)$  و گروه با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر  $(5/3 \pm 94/50)$  در مقایسه با گروه کنترل  $(0/10 \pm 77/9)$  افزایش معنی‌دار در گروه با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سطح معنی‌داری  $(p < 0.01)$  نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (نمودار ۳).



نمودار ۳: اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در ایجاد آنتروم  $p\text{-value} < 0.01$  =\*\*

### بررسی بیان ژن‌های *GDF-9*، *BMP7* و *BMP15* در فولیکول‌ها با استفاده از تکنیک *Real Time PCR*

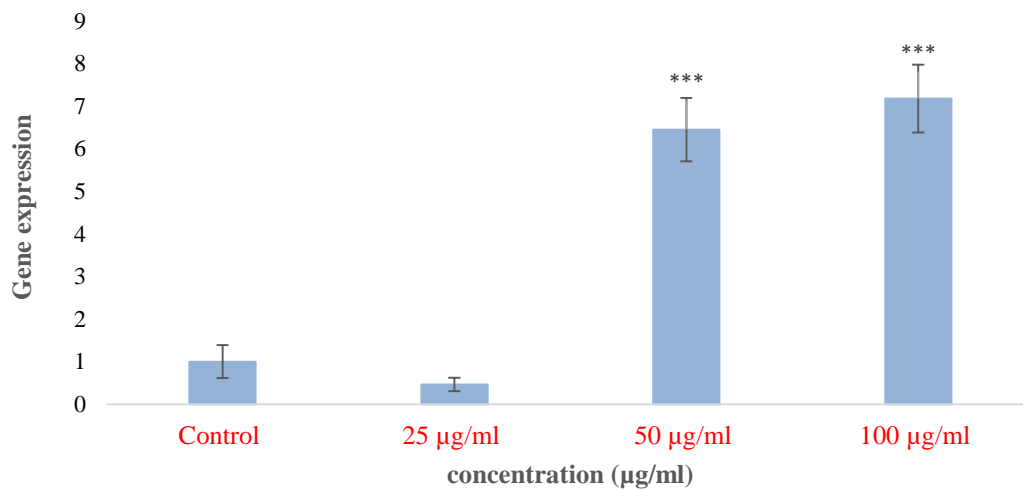
مقدار بیان ژن *GDF-9* در فولیکول‌ها بررسی شد. نتایج نشان دهنده افزایش بیان ژن مذکور در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل بود به طوری که در گروه با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این افزایش در سطح معنی‌داری

$P < 0.01$  (نمودار ۴)نمودار ۴: نتایج بیان ژن GDF-9 در فولیکول‌ها  $P < 0.01$  (\*\*\*)

#### بررسی میزان بیان ژن BMP-7 در فولیکول‌ها

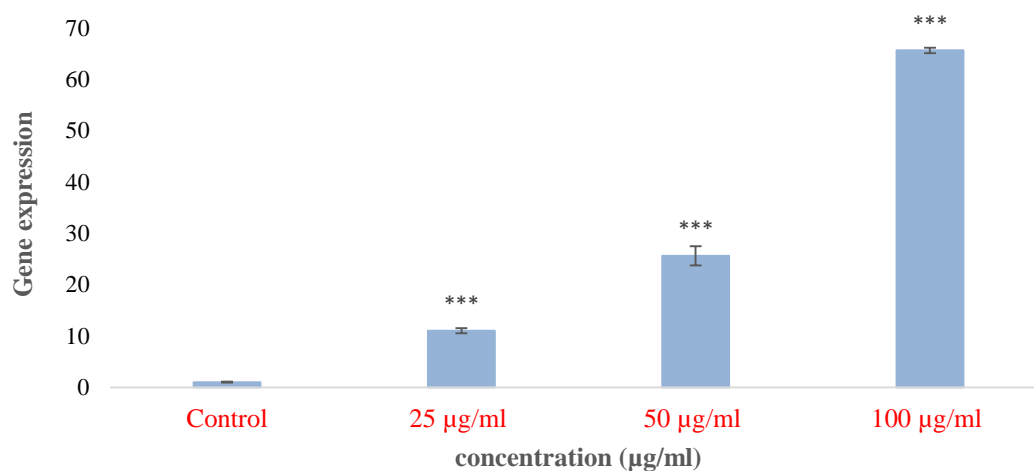
مقدار بیان ژن BMP-7 در فولیکول‌ها بررسی شد. نتایج نشان دهنده ی افزایش بیان ژن BMP-7 در گروه‌های تیماری با

غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سطح معنی‌داری  $P < 0.01$  (\*\*\*) بود (نمودار ۵)

نمودار ۵: نتایج بیان ژن BMP-7 در فولیکول‌ها  $P < 0.01$  (\*\*\*)

### بررسی میزان بیان ژن BMP-15 در فولیکول‌ها

مقدار بیان ژن BMP-15 در فولیکول‌ها بررسی شد. نتایج نشان دادند در گروه اگزوزوم 100 µg/ml مقدار بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنی‌داری  $P < 0.001$  افزایش یافته است (نمودار ۶).



نمودار ۶: نتایج بیان ژن BMP-15 در فولیکول‌ها  $P < 0.001$

### ۵- بحث

امروزه مشکل ناباروری در دنیای به صورت یک نگرانی اجتماعی درآمده است و می‌تواند ضربه روانی شدیدی به زوجین وارد سازد (۱۳). نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد میزان ناباروری در جوامع بشری رو به افزایش است (۱۳). فعال کردن روند تقسیم میوز در اووسیت و بلوغ آن از اهداف مهم درمانی محققین علوم ناباروری بوده است. بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها (In Vitro Maturation IVM) برای اولین بار توسط Leibfried و همکاران مطرح (۱۴) شد. آن‌ها توانستند بدون استفاده از هورمون، تقسیم میوز را در اووسیت‌های فولیکول خردگوش فعال کنند و اووسیت‌های نابالغ (Germinal Vesicle GV) را به مرحله GVBD (Germinal Vesicle Breakdown) برسانند. در طول زندگی باروری، بیش از ۹۹ درصد از فولیکول‌های تخمدان طی فرآیندی به نام آترزی فولیکولی پس از تولد که تا حد زیادی در روند مناسب فولیکولوژنز و به دنبال آن باروری بسیار موثر است، تخریب می‌شوند. همچنین طی چندین دهه اخیر، به‌کارگیری تکنولوژی‌های تولیدمثلی همچون بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). در زمینه بلوغ آزمایشگاهی تخمک تحقیقات زیادی بر روی بلوغ سیتوپلاسم آن نیز صورت گرفته است زیرا بلوغ سیتوپلاسم تخمک نقش مهمی در لقاح آزمایشگاهی می‌تواند داشته باشد (۱۶).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اگزوزوم استخراج شده از سلول‌های مغز استخوان باعث ازدیاد زیستایی فولیکول‌های تخمدانی می‌شود. Wycherley و همکاران (۱۷) سیستم کشت ساده و جدیدی را برای کشت فولیکول‌های پره آنترال موش ارائه کردند. آن‌ها فولیکول‌ها را در قطرات معلق و در ظروف ۹۶ خانه، بدون پوشش روغن کشت دادند و با روش معمول همراه یا بدون روغن مقایسه کردند. محیط کشت مورد استفاده آنها حاوی FSH انسانی و اسید اسکوربیک بود. آن‌ها دریافتند، در این روش فولیکول‌ها رشد بیشتری را نسبت به دو روش دیگر پیدا کرده‌اند. تکثیر سلول‌های فولیکولی نیز به طور قابل توجهی

افزایش نشان داد. بنابراین آن‌ها روش فوق را روشی مناسب تر برای کشت فولیکول دانستند. نتایج این پژوهش تجربی نیز نشان داد تیمار فولیکول‌ها با اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش زیستایی فولیکول‌ها می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار فولیکول‌های تخمدانی با اگزوزوم‌های مشتق از مغز استخوان موش، موجب افزایش قطر فولیکول‌ها وابسته به غلظت می‌شوند. همچنین نتایج این تحقیق موید این موضوع بود که اگزوزوم‌های مشتق از مغز استخوان دارای تاثیر بر روی پارامترهای تکوینی فولیکول‌ها نظیر بلوغ فولیکول و تشکیل حفره‌ی آنتروم هستند به طوری که با افزایش غلظت اگزوزوم‌ها این پارامترها دچار تغییرات مثبت به صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل می‌شوند.

شوری و همکاران اثر عصاره بافت تخمدان را بر روی موش بررسی کردند که نشان داد که عصاره بافت تخمدان یک عامل تکثیری و بلوغی است که باعث رشد و تکوین فولیکول پره آنترال تا مرحله بلوغ می‌شود و باعث افزایش قطر فولیکول و بقا می‌شود که در آزمایش حاضر نیز اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش در قطر فولیکول و بقا شده است که نتایج پژوهش حاضر هم‌راستا با نتایج گزارش شده توسط شوری و همکاران است (۱۸).

همچنین در مطالعه‌ای که توسط khazaei و همکاران (۱۹) بر روی موش انجام شد، نشان داد که استفاده از مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم از عصاره‌ی الکلی رازیانه در ۶ روز باعث افزایش بقا فولیکول و تعداد فولیکول می‌شود که با نتایج این تحقیق در خصوص تیمار با اگزوزوم‌ها هم‌راستا است

در مطالعه‌ای دیگر Mazangi و همکاران (۲۰) اثر ژل رویال که دارای ترکیبات فنلی می‌باشد، به محیط کشت اضافه کردند که نتایج نشان می‌دهد که ژل رویال باعث بلوغ برون تنی اووسیت و منجر به افزایش نرخ بلوغ اووسیت شده است که هم‌راستا با پژوهش حاضر است.

در تحقیقی مشابه محمد نبیونی و همکاران (۲۱) نشان داد که زهر زنبور عسل سبب افزایش معنی‌داری در سیر بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره آنترال شده در نتیجه موجب آمادگی بهتر برای لقاح می‌شود که این می‌تواند مربوط به اثرات ضد التهابی آن باشد. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که تیمار فولیکول‌ها با غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزوزوم‌ها موجب بلوغ و آزاد سازی تخمک از فولیکول به صورت معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) تیمار فولیکول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزوزوم‌ها موجب بلوغ و آزاد سازی تخمک از فولیکول به صورت معنی‌داری ( $p < 0/001$ ) می‌شود که این نتایج هم‌راستا با تحقیق فوق بود.

در پژوهش حاضر فولیکول‌های پره آنترال موش با استفاده از سوزن سرنگ انسولین جداسازی شدند و به مدت ۱۴ روز در محیط کشت  $\alpha$ -MEM بهینه‌سازی شده و با غلظت‌های متفاوت اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی کشت داده شدند و قطر فولیکول‌ها و میزان رشد و بلوغ آن مورد بررسی قرار گرفتند که هم‌راستا با مطالعه آذرینیا و همکاران (۲۲) است آن‌ها اثر توام متفورمین و زهر زنبور بر بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره آنترال موش را مورد بررسی قرار دادند و فولیکول‌ها را از تخمدان موش‌های ۱۴ روزه به صورت مکانیکی جداسازی شده و در محیط کشت قطره‌ای  $\alpha$ -MEM دارای روغن مینرال به مدت ۱۴ روز کشت داده شد، متفورمین و زهر زنبور نیز به طور جداگانه و نیز هم‌افزایی به محیط کشت افزوده شدند و قطر فولیکول‌ها تا روز چهارم کشت و بقای آن‌ها به صورت هر دو روز یک‌بار مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت همچنین در روز ۱۲ کشت به جهت القای اوولاسیون hCG افزوده شد. نتایج این پژوهش تجربی نیز هم‌راستا با تحقیق فوق بود.

همچنین بیان ژن‌های BMP-7 و BMP-15 و GDF-9 در فولیکول‌های تخمدانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آزمون Real Time PCR نشان داد که هنگامی که فولیکول‌های تخمدانی مستخرج از موش، در معرض آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های مغز استخوان قرار گرفتند بیان ژن‌های مذکور افزایش یافته است.

مارکرهای مولکولی مختلفی برای تعیین توان تکوینی اووسیت و فولیکول‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. مهم‌ترین مارکرهای اعضای سوپر خانواده TGF- $\beta$  شامل GDF9 و BMP15 می باشد که از تخمک ترشح می‌شوند و از اعضای کلیدی این سوپر خانواده محسوب می‌شوند و نقش بسیار مهمی در تمایز اووسیت در طی اووژنز و فولیکوژنز دارند (۲۳). Demeestere و همکاران (۲۴) به بررسی نقش سینرژیک ژن BMP-15 در تکوین و عملکرد کمپلکس اووسیت - کومولوس در موش پرداخته که باعث پیشروی تکوین و عملکرد فولیکول می‌شود. در این پژوهش نیز نتایج نشان داد با افزایش غلظت آگروزوم‌ها بیان ژن BMP-15 نیز افزایش می‌یابد.

در مطالعه‌ی حاضر بیان ژن BMP-4 و BMP-15 نیز با بلوغ اووسیت افزایش یافت و نتایج به‌دست‌آمده مشابه با مطالعات Kathirvel (۲۵) است. وی بیان ژن‌های BMP-4 و BMP-15 در طی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت را مورد بررسی قرارداد و مشخص کرد که این دو ژن در طی فرآیند بلوغ به‌طور افتراقی بیان می‌شوند و الگو بیان BMP-15 به‌طور خاص با زمان گسترش سلول‌های کومولوس هم‌زمان است.

## ۶- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود که آگروزوم‌ها دارای اثر مثبت بر بلوغ و رشد فولیکول‌های تخمدانی می‌باشند.

## ۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی که در انجام این پژوهش تجربی همکاری داشتند تشکر می‌کنند.

## ۸- منابع

1. Rooney KL, Domar AD. The relationship between stress and infertility. *Dialogues Clin Neurosci.* 2018;20(1):41-7.
2. Akbaribazm M, Goodarzi N, Rahimi M. Female infertility and herbal medicine: An overview of the new findings. *Food Sci Nutr.* 2021 Aug 15;9(10):5869-5882
3. Farrokhyar S, Baharara J, Eidi A, Hayati Rodbari N. 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. *iranjournals.nlai.ir.* 2020;12(4):1-8.
4. Fierabracci A, Del Fattore A, Luciano R, Muraca M, Teti A, Muraca M. Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: The role of microvesicles. *Cell Transplant.* 2015;24(2):133-49.
5. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012 Jun 14;10(6):709-716.
6. Figueroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury M. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res.* 2012;45(3):269-77.
7. Sarvar DP, Shamsasenjan K, Akbarzadehlaleh P. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: New opportunity in cell-free therapy. Vol. 6, *Advanced Pharmaceutical Bulletin.* 2016. p. 293-9.

8. Bruschi M, Ravera S, Santucci L, Candiano G, Bartolucci M, Calzia D, et al. The human urinary exosome as a potential metabolic effector cargo. *Expert Rev Proteomics*. 2015 Aug 1;12(4):425–32.
9. Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci*. 2013 Jul 9;14(7):14240–69.
10. Fierabracci A, Del Fattore A, Luciano R, Muraca M, Teti A, Muraca M. Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles. *Cell Transplant*. 2015;24(2):133–49.
11. Shoorei H, Salehnia M, Abdi S. The effects of different concentrations of ovarian tissue extract on preantral mouse follicle development after three-dimensional culture. *Modares J Med Sci Pathobiol*. 2016;19(4):41–53
12. De Los Reyes M, Palomino J, Araujo A, Flores J, Ramirez G, Parraguez VH, et al. Cyclooxygenase 2 messenger RNA levels in canine follicular cells: interrelationship with GDF-9, BMP-15, and progesterone. *Domest Anim Endocrinol*. 2021;74:106529.
13. Jonaidey E, Noorani Sadodin SH, Mokhber N. Comparing the marital satisfaction in infertile and fertile women referred to the public clinics in Mashhad. *Iran J Obs Gynecol Infertil*. 2009;12(1):7–16.
14. Leibfried ML, Bavister BD. Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters. *J Exp Zool*. 1983 Jun;226(3):481–5.
15. Foix-L'Hélias L, Grynberg M, Ducot B, Frydman N, Kerbrat V, Bouyer J, et al. Growth development of French children born after in vitro maturation. *PLoS One*. 2014 Jan;9(2):e89713.
16. Chang EM, Song HS, Lee DR, Lee WS, Yoon TK. In vitro maturation of human oocytes : Its role in infertility treatment and new possibilities. *Clin Exp Reprod Med*. 2014;41(2):41–6.
17. Wycherley, G., Downey, D., Kane, M. T., & Hynes, A. C. A novel follicle culture system markedly increases follicle volume, cell number and oestradiol secretion. *Reproduction*, 2004; 127(6): 669–677
18. Shoorei H, Salehnia M, Abdi S. The Effects of Different Concentrations of Ovarian Tissue Extract on Preantral Mouse Follicle Development after Three-dimensional Culture. *mjms*. 2017;19(4):41–53.
19. Khazaei M, Montaseri A, Khazaei MR, Khanahmadi M. Study of foeniculum vulgare effect on folliculogenesis in female mice. *Int J Fertil Steril*. 2011;5(3):122–7.
20. Mazangi HR, Deldar H, Kashan NE, Mohammadi-Sangcheshmeh A. 305 ROYAL JELLY TREATMENT DURING OOCYTE MATURATION IMPROVES *<i>IN VITRO</i>* MEIOTIC COMPETENCE OF GOAT OOCYTES BY INFLUENCING INTRACELLULAR GLUTATHIONE SYNTHESIS AND APOPTOSIS GENE EXPRESSION. *Reproduction, Fertility and Development*. 2014;27(1):241–5
21. Nabiuni M, KAKAEI M, Nazari Z, Karimzadeh L. Effect of honey bee venom on in vitro maturation of preantral follicles in NMRI mice. *J Sci Tarbiat MoallemUniversity*. 2013;13(1):749–60.
22. Azarnia M, Nabuni M, Kouchesfahani mohseni H, Tousu A. The effects of metformin and bee venom on in vitro maturation of isolated preantral follicles in mice. *J Anim Res (IRANIAN J Biol)*. 2013;26(3):228–36.
23. Piotrowska H, Kempisty B, Sosinska P, Ciesiolka S, Bukowska D, Antosik P, et al. The role of TGF superfamily gene expression in the regulation of folliculogenesis and oogenesis in mammals: a review. *Veterinárni medicína*. 2013;v.58 no.10(no. 10):pp. 505–15.
24. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*. 2005 Aug;130(2):147–56.
25. Kathirvel M, Soundian E, Kumanan V. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 ( GDF9 ) and Bone transcripts during in vitro maturation of buffalo ( *Bubalus bubalis* ) cumulus – oocyte complexes. *Springerplus*. 2013;2(1)(206):2–6.