



Evaluation of the effects of PI3K pathway regulators on human arrested type I embryos in vitro

Karami N^a, Hassani F^{b*}, Eftekhari-Yazdi P^{b*}, Taei A^c, Hassani SN^c

^a Faculty of New Biotechnology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

^b Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

^c Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, P.O. Box 19395-4644, Tehran, Iran

Use your device to scan and read the article online



Citation: Karami N, Hassani F, Eftekhari-Yazdi P, Taei A, Hassani SN. Evaluation of the effects of PI3K pathway regulators on human arrested type I embryos in vitro.. Journal of Cell and Tissue . 2024; 15(3):246.



KEYWORDS

Preimplantation embryo
In vitro fertilization (IVF)
Embryonic Arrest
PI3K pathway

ABSTRACT

Aim: Infertility is a complex issue that affects many couples worldwide. In vitro fertilization (IVF) has been a groundbreaking technique in addressing this challenge, but it comes with its own set of problems in the development of embryos during the pre-implantation stages. Understanding the processes involved in embryo development is crucial in overcoming these hurdles. During the pre-implantation stage, one of the challenges of treating infertility through in vitro fertilization is the developmental arrest of the embryo. In embryonic arrest, cell division stops for at least 24 hours, which, if it occurs in infertility treatments, leads to failure in ART cycles.

Cell signaling pathways play a vital role in the development and progression of embryos. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway, known for its efficiency in regulating the cell cycle and various cellular processes, was the aim of this study. By targeting this pathway, we aimed to explore the effects of specific factors - ITS (Insulin, Transferrin, Selenium), Essential E8 medium (E8), and the CHIR99021 small molecule - on the resumption of development in type I arrested human embryos under in vitro conditions.

Material and Methods: In this study, firstly, after receiving ethics approval and patient consent, day 3 embryos (2-3 cell stage) from the Embryology Department of Royan Research Institute were utilized. The experimental groups consisted of control, CHIR99021, ITS, and E8. The optimum concentrations were chosen 1 for CHIR99021, 0.5% for ITS, and 0.1% for E8 + 10% serum. The culture medium for these groups was prepared and covered with liquid paraffin before being incubated at 37°C and 5% CO₂ for 4 hours. Subsequently, the embryos were transferred randomly to either experimental or control groups and cultured in an incubator for 48 to 72 hours. Morphological evaluations of the embryos were conducted using an inverted microscope. Data analysis was performed using SPSS software and chi-square test, with a significance threshold set at P<0.05.

Results: The findings of the study revealed that the rate of arrest in the CHIR99021 and ITS groups showed a significant reduction compared to the control group. Moreover, all three experimental groups (ITS, CHIR99021, and E8) exhibited a notable increase in development

* Corresponding author. Tel.:08632627234, Fax: 0834173406

E-mail address: F.hassani@royaninstitute.org, eftekhari@royaninstitute.org

DOI: : <https://10.61186/JCT.15.3.246>

Received: 22 Jul. 2024; Received in revised form: 25 Sep. 2024; Accepted: 5 Oct. 2024

Original Article

© Author



rate up to the pre-morula stage when compared to the control group. Interestingly, while none of the embryos in the control group progressed to the blastocyst stage, two embryos in each of the CHIR99021 and ITS groups reached this advanced developmental stage.

Conclusion: In conclusion, the study's outcomes indicate the notable effect of ITS and CHIR99021 in modulating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to stimulate cell cycle progression in type I arrested embryos. ITS factor is probably able to regulate this pathway by activating insulin receptors and small molecule CHIR99021 by inhibiting Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3). These findings hold promise for further research and potential applications in improving the success rates of IVF treatments and addressing infertility challenges. Understanding the mechanisms of embryo development is crucial for advancing reproductive medicine. It is important to note that the statistical population used in this study was limited and it is believed that more research is needed.



ارزیابی تاثیرات تنظیم‌کننده‌های مسیر PI3K بر جنین‌های متوقف‌شده انسانی نوع یک در آزمایشگاه

نرگس کرامی^۱، فاطمه حسنی^{۲*}، پوپک افتخاری یزدی^{۲*}، عادل طائی^۳، سیده نفیسه حسنی^۳

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران^۱
^۲ پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
^۳ پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: یکی از چالش‌های لقاح آزمایشگاهی، توقف تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی است. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیرات تنظیم‌کننده‌های مسیر PI3K بر از سرگیری تکوین جنین‌های متوقف‌شده انسانی نوع یک در شرایط آزمایشگاهی است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، با رضایت آگاهانه بیماران، از جنین‌های ۲ تا ۳ سلولی متوقف‌شده ۷۲ ساعته انسانی بخش جنین‌شناسی پژوهشگاه رویان، استفاده شد. گروه‌های مطالعه، شامل کنترل، CHIR99021 (۱ میکرومولار)، ITS (۰/۵ درصد) و E8 (۰/۱ درصد + ۱۰ درصد سرم) بود. محیط‌های کشت، بهمدت ۴ ساعت انکوبه شدند و سپس جنین‌ها بهطور تصادفی به گروه‌ها منتقل و بهمدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت کشت داده شدند. در نهایت مورفولوژی جنین‌ها توسط میکروسکوپ اینورت ارزیابی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ارزیابی و آستانه معنیداری $p < 0.05$ اتخاذ شد. نتایج: نرخ توقف در گروه‌های CHIR99021 و ITS، نسبت به گروه کنترل، کاهش معنیداری پیدا کرد. همچنین نرخ تکوین تا مرحله پیش از مورولا در هر سه گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل، افزایش معنیداری یافت. در حالیکه در گروه کنترل هیچ یک از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست نرسیدند، در هر یک از گروه‌های CHIR99021 و ITS، دو جنین تا مرحله بلاستوسیست پیشرفت کردند. نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که ITS و CHIR99021 با تنظیم مسیر PI3K در القای چرخه سلولی جنین‌های متوقف‌شده نوع یک، تاثیر به‌سزایی دارند.</p>	<p>جنین‌پیش از لانه‌گزینی لقاح آزمایشگاهی (IVF) توقف جنینی مسیر PI3K</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴</p>

۱- مقدمه

لقاح آزمایشگاهی (IVF, In Vitro Fertilization) یکی از روش‌های کمک باروری (ART, Assisted Reproductive Technology) است که برای کمک به زوج‌های ناباروری که دوازده ماه بدون پیشگیری از بارداری موفق به بارداری طبیعی

نشده‌اند، استفاده می‌شود (۱). توقف جنین پیش از لانه‌گزینی یکی از چالش‌های رایج در فرایند لقاح آزمایشگاهی است (۲). تحقیقات نشان می‌دهد که درصد قابل توجهی از جنین‌ها در طی این فرایند و قبل از رسیدن به مرحله بلاستوسیست، دچار توقف می‌شوند (۳، ۴). پدیده توقف زمانی رخ می‌دهد که جنین‌ها در مدت زمان حداقل ۲۴ ساعت تقسیم نشوند و معمولا ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از لقاح رخ می‌دهد. توقف تکوین جنین می‌تواند در سطوح جنینی و والدینی بررسی شوند. در سطح جنینی اختلال در وضعیت کروموزومی، متابولیسمی، الگوهای متیلاسیون، بیان ژن، فعالیت میتوکندری و RNAهای غیر کدکننده کوچک می‌تواند باعث القای توقف تکوین شود. در سطوح والدینی نیز میتوان به بیماری‌های منجر به ناباروری، اختلال در فاکتورهای وابسته به ژنتیک، فولیکول و DNA اشاره کرد (۵). در مطالعه ای که اخیرا توسط Yang و همکاران (۶) انجام شد، جنین‌های متوقف‌شده را به سه دسته طبقه بندی کردند. جنین‌های متوقف‌شده نوع یک در طی فرایند (Maternal To Zygote Transition) MZT و فعال شدن ژنوم جنینی (EGA, Embryonic Genome Activation) با اختلالاتی مواجه می‌شوند و از نظر تکوینی معمولا در نزدیکی مرحله چهار سلولی مشاهده می‌شوند. علاوه بر این، در این جنین‌ها، تعداد قابل توجهی از تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی مهار می‌شوند. بر خلاف جنین‌های متوقف‌شده نوع یک، جنین‌های متوقف‌شده نوع دو و سه در فرایند MZT مشکلی ندارند. این جنین‌ها که از نظر مرحله تکوینی، بین مراحل ۴ سلولی تا مورولا متوقف می‌شوند، دچار کاهش فعالیت در چرخه سلولی خود می‌شوند. همچنین سطوح متغیری از گلیکولیز و فسفریلاسیون اکسیداتیو در آن‌ها قابل مشاهده است (۶).

مسیرهای پیام‌رسانی سلولی برای ارتباط سلولی و انجام وظایف سلول‌ها ضروری هستند. یکی از مسیرهای مهم مربوط به تکثیر و تکوین سلولی، مسیر پیام‌رسانی PI3K (phosphatidylinositol 3-kinases) است. این مسیر در اکثر سلول‌ها فعال است و در فرایندهای سلولی متعددی مانند تکثیر، مهاجرت، رشد، بقا و هموستاز متابولیک دخالت دارد (۷). فعال شدن مسیر PI3K میتواند از طریق سیگنال‌های مختلف خارج سلولی رخ دهد (۸). پس از فعال شدن، PI3K باعث فعال شدن مسیرهای پایین دستی مانند WNT و mTOR می‌شود. MTORC1 فعال شده، نقش تنظیمی در فرایندهای سلولی مختلف، از جمله رشد سلولی، پیشرفت چرخه سلولی، بیوژنز ریبوزوم و سنتز mRNA، پروتئین و نوکلئوتید از طریق کیناز S6 (S6K) ایفا می‌کند (۹). با توجه به اینکه مسئله اصلی در جنین‌های متوقف‌شده در چرخه سلولی نهفته است. هدف ما در این مطالعه، استفاده از کوچک‌مولکول‌ها، فاکتورهای رشد و محیط‌هایی است که می‌توانند چرخه سلولی جنین‌های متوقف‌شده نوع یک (دو تا سه سلولی) را با تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی سلولی تحریک کنند.

۲- مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جنین‌ها: این مطالعه تجربی با رعایت اصول مندرج در اعلامیه هلسینکی و تاییدیه کمیته اخلاقی پژوهشگاه رویان (تهران، ایران؛ شماره تاییدیه: IR.ACECR.ROYAN.REC.1402.007) انجام شد. معیارهای ورود شامل انتخاب جنین‌های ۷۲ ساعته‌ای بود که رشد آن‌ها متوقف شده و تعداد سلول‌های آن‌ها ۲ تا ۳ عدد بود.

محیط کشت و کشت جنین: محیط کشت گروه‌های آزمایشی از محیط SAGE 1-Step حاوی دوزهای یک میکرومولار از کوچک مولکول CHIR99021، ۵٪ درصد از محیط ITS (Insulin, Transferrin, and Selenium)، ۱٪ درصد از محیط E8 (Essential 8) حاوی ۱۰ درصد سرم و گروه کنترل (فقط شامل SAGE 1-Step) ساخته شد. مشخصات مواد استفاده شده در محیط‌های کشت تیمار در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: مشخصات اجزای محیط‌های کشت تیمار

ماده	شماره کاتالوگ	شرکت سازنده
CHIR99021	04-0004-10	Stemgent
ITS	41400045	Gibco
E8	A15169 Supplement E8: A15171	Gibson
Sage 1-Step	REF 67020010A	Origio

پس از آماده سازی محیط کشت گروه‌های آزمایشی، قطره های ۱۰ میکرولیتری از محیط مورد نظر با دقت در پتری دیش قرار داده شد. سپس برای پوشاندن قطره‌ها، پارافین مایع اضافه شد و ظروف کشت در محیط کنترل شده انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO₂ بهمدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس جنین‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Olympus, Japon) برای ارزیابی مورفولوژی، مورد بررسی و عکس‌برداری قرار گرفتند. پس از ثبت کیفیت هر جنین، آنها به پتری دیش‌های انکوبه شده منتقل شدند. جنین‌ها قبل از اینکه بهطور تصادفی به گروه‌های آزمایشی یا کنترل منتقل شوند، چندین بار با استفاده از قطره‌های SAGE 1-Step شستشو داده شدند. سپس این جنین‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و تا روز ۵ یا ۶ کشت داده شدند. پس از طی دوره کشت، از یک میکروسکوپ اینورت برای ارزیابی جنین‌ها استفاده شد.

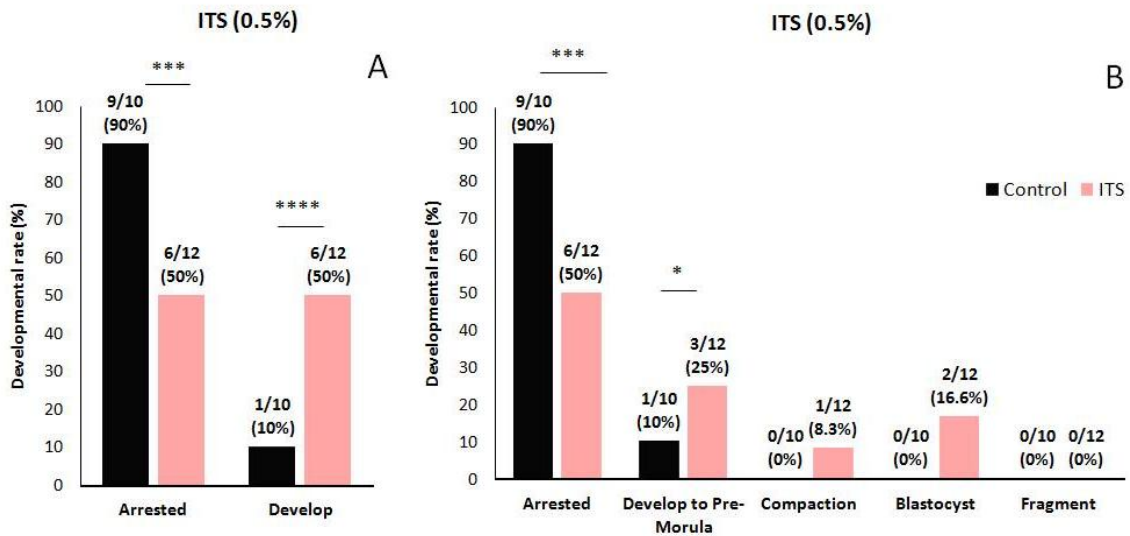
۳- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۲) انجام شد. متغیرهای مربوط به مراحل تکوینی با استفاده از آزمون ناپارامتریک کای دو ارزیابی شد. آستانه معنیداری $p < 0.05$ اتخاذ شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel رسم شدند.

۴- نتایج

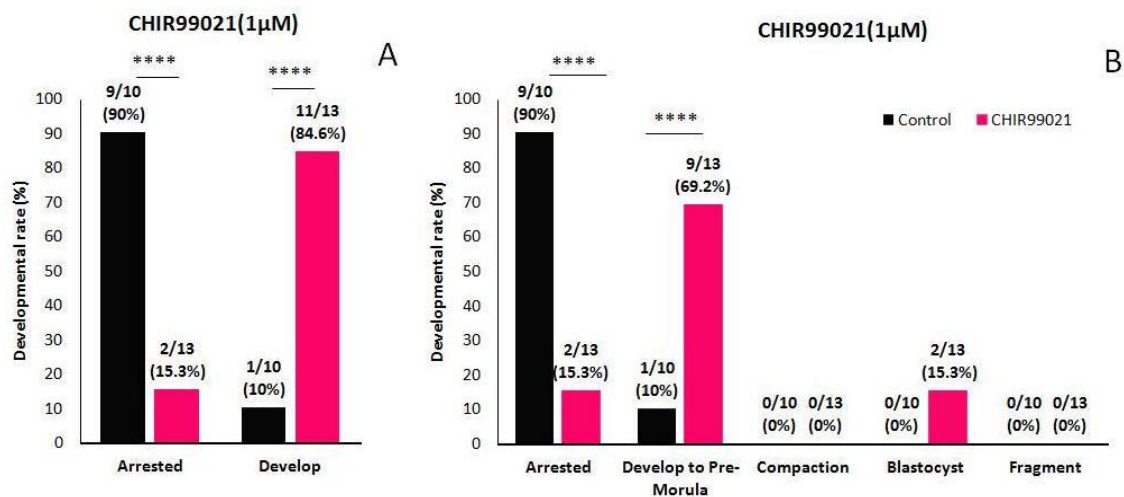
تعداد ده جنین متوقف‌شده نوع یک (دو و سه سلولی) در گروه کنترل بهمدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند که تنها ده درصد آنها (یک جنین) از توقف خارج و تا مرحله پیش از مورولا پیشرفت داشت. جنین‌ها موفق نشدند به مرحله مورولا و بلاستوسیست برسند.

تعداد ۱۲ جنین متوقف‌شده نوع یک در گروه آزمایشی ITS به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند که ۵۰ درصد آنها (شش جنین) از توقف خارج شدند. در مقایسه با گروه کنترل، نرخ توقف و تکوین به ترتیب کاهش ($p=0.001$) و افزایش معنیداری را نشان داد ($p < 0.0001$) (شکل A۱). نرخ تکوین تا مرحله پیش از مورولا و مورولا (Compaction) بهترتیب، ۲۵ درصد (سه جنین) و ۸/۳ درصد (یک جنین) بود که اختلاف آن برای تکوین تا مرحله پیش از مورولا معنیدار بود ($p=0.011$) همچنین نرخ تشکیل بلاستوسیست ۱۶/۶ درصد (دو جنین) بود (شکل B۱).



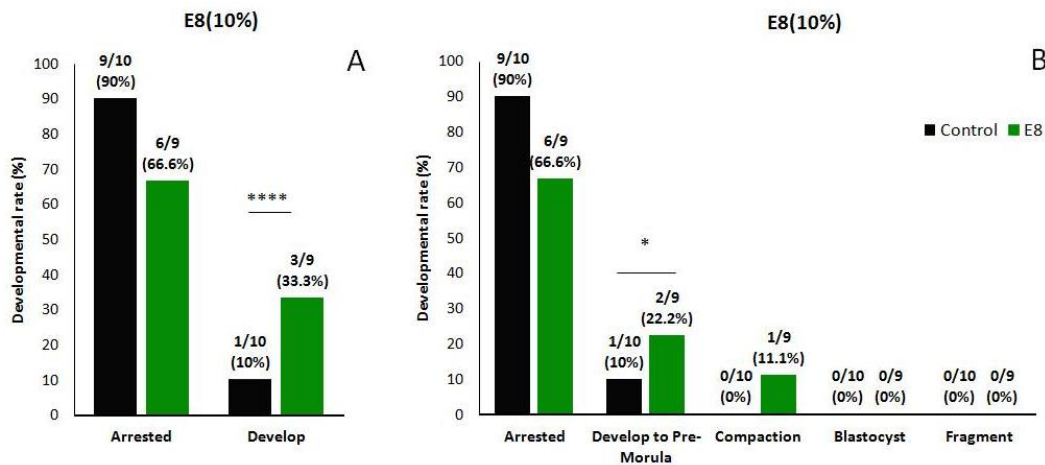
شکل ۱: تاثیر ماده ITS بر پیشرفت تکوین جنین‌های متوقف‌شده: جنین‌های متوقف‌شده پس از کشت در دو گروه آزمایشی ITS و کنترل با یکدیگر مقایسه شدند. در مقایسه گروه ITS با کنترل، نرخ توقف و تکوین به ترتیب کاهش ($p=0.001$) و افزایش ($p<0.0001$) و همچنین تکوین تا مرحله پیش از مورولا، افزایش معنیداری را نشان دادند. داده‌ها توسط آزمون آماری غیر پارامتریک Chi-square آنالیز شدند. ($p<0.05$, *، **، ***، ****؛ $p<0.001$, ****؛ $p<0.0001$, *****)

تعداد ۱۳ جنین متوقف‌شده نوع یک (دو و سه سلولی) در گروه آزمایشی CHIR99021 به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند که ۸۴/۶ درصد آن‌ها (۱۱ جنین) از توقف خارج شده و نرخ توقف نسبت به گروه کنترل، کاهش معنیداری را نشان داد ($p<0.0001$) (شکل A۲). همچنین افزایش نرخ تکوین در مقایسه با کنترل نیز معنیدار بود ($p<0.0001$). نرخ تکوین تا مرحله پیش از مورولا، ۶۹/۲ درصد (نه جنین) بود که افزایش معنیداری را نشان داد ($p<0.0001$). همچنین نرخ تشکیل بلاستوسیست ۱۵/۳ درصد (دو جنین) بود (شکل B۲).



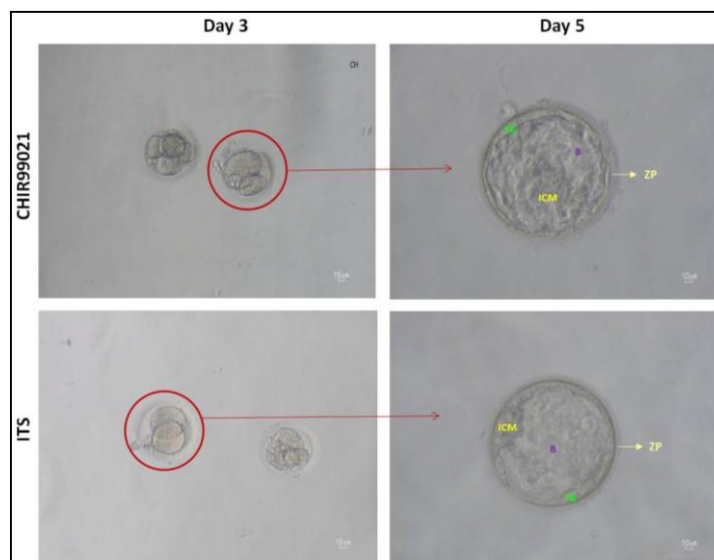
شکل ۲: تاثیر ماده CHIR99021 بر پیشرفت تکوین جنین‌های متوقف‌شده نوع یک: جنین‌های متوقف‌شده پس از کشت در دو گروه آزمایشی CHIR99021 و کنترل با یکدیگر مقایسه شدند. در مقایسه با گروه کنترل نرخ توقف و تکوین بهترتیب کاهش و افزایش و همچنین نرخ تکوین تا مرحله پیش از مورولا نیز افزایش معنیداری را نشان دادند ($p<0.0001$). داده‌ها توسط آزمون آماری غیر پارامتریک Chi-square آنالیز شدند. (**، ***، ****؛ $p<0.001$, *****)

تعداد نه جنین متوقف‌شده نوع یک (دو و سه سلولی) در گروه آزمایشی E8 به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند که ۳۳/۳ درصد آن‌ها (سه جنین) از توقف خارج شدند. در مقایسه با گروه کنترل، نرخ تکوین، افزایش معنیداری را نشان داد ($p < 0.0001$) (شکل A۳). نرخ تکوین تا مرحله پیش از مورولا و مورولا (Compaction) بهترتیب، ۲۲/۲ درصد (دو جنین) و ۱۱/۱ درصد (یک جنین) بود که اختلاف آن برای تکوین تا مرحله پیش از مورولا نسبت به کنترل، افزایش معناداری را نشان داد ($p = 0.034$). (شکل B۳).



شکل ۳: تاثیر ماده E8 بر پیشرفت تکوین جنین‌های متوقف‌شده: جنین‌های متوقف‌شده پس از کشت در دو گروه آزمایشی E8 و کنترل با یکدیگر مقایسه شدند. افزایش نرخ تکوین در مقایسه با کنترل معنی‌دار بود ($p < 0.0001$). همچنین نرخ تکوین تا مرحله پیش از مورولا افزایش معنیداری را نشان داد ($p = 0.034$). داده‌ها توسط آزمون آماری غیر پارامتریک Chi-square آنالیز شدند. ($p < 0.05$, ***, $p < 0.0001$)

مورفولوژی بلاستوسیست‌های حاصل از جنین‌های متوقف‌شده پس از تیمار با ITS و CHIR99021 در شکل ۴ آمده است.



شکل ۴: مورفولوژی جنین‌های تحت تیمار با ITS و CHIR99021: تصویر نشان‌دهنده جنین‌های متوقف‌شده قبل (سمت چپ) و بعد (سمت راست) از تیمار با ITS و CHIR99021 است. جنین‌های متوقف‌شده که ۷۲ ساعت از لقاح آن‌ها گذشته بود و ۲ تا ۳ سلول داشتند، به‌صورت تصادفی به محیط‌های کشت تیمار منتقل شدند و تصویر آن‌ها ثبت گردید. سپس بعد از ۴۸ ساعت بلاستوسیست‌های حاصله مجدداً تحت عکسبرداری قرار گرفتند. (توده سلولی داخلی: ICM، تروفواکتودرم: TE، حفره بلاستوسل: B، زونا پلوسیدا: ZP)

در مطالعه ای که Yang و همکاران (۶) انجام دادند، توانستند از طریق فعال سازی SIRT1 بوسیله‌ی رزوراترول، تا حدی بر توقف جنین‌های متوقف شده نوع یک و دو غلبه کنند. در جدول ۲، نتایج حاصل از تاثیر ماده رزوراترول و تنظیم کننده‌های مسیر PI3K در جنین‌های متوقف شده حاصل از IVF با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

جدول ۲: مقایسه نتایج گروه‌های آزمایشی با گروه رزوراترول

انواع جنین‌های متوقف شده	نرخ تکوین (%)		توقف	تکوین	پیش از مورولا	مورولا	بلاستوسیست	قطعه قطعه شدن
	تنظیم کننده	تنظیم کننده						
نوع یک و دو (مطالعه Yang)	رزوراترول	۱۹/۴۲ (۴۵٪)	۲۳/۴۲ (۵۵٪)	۱۰/۴۲ (۲۴٪)	۶/۴۲ (۱۴٪)	۳/۴۲ (۷٪)	۴/۴۲ (۱۰٪)	
نوع یک (مطالعه حاضر)	E8	۶/۹ (۶۶٪)	۳/۹ (۳۳.۳٪)	۲/۹ (۲۲.۲٪)	۱/۹ (۱۱.۱٪)	۰/۹ (۰٪)	۰/۹ (۰٪)	
	CHIR99021	۲/۱۳ (۱۵.۳٪)	۱۱/۱۳ (۸۴.۶٪)	۹/۱۳ (۶۹.۲٪)	۰/۱۳ (۰٪)	۲/۱۳ (۱۵.۳٪)	۰/۱۳ (۰٪)	
	ITS	۶/۱۲ (۵۰٪)	۶/۱۲ (۵۰٪)	۳/۱۲ (۲۵٪)	۱/۱۲ (۸.۳٪)	۲/۱۲ (۱۶.۶٪)	۰/۱۲ (۰٪)	

۵- بحث

در این مطالعه، افزودن تنظیم کننده‌های مسیر پیام‌رسانی PI3K به محیط کشت، موجب بهبود تکوین جنین‌ها شده و سبب تحریک چرخه سلولی می‌شود. این مسیر توسط RTKها (Receptor tyrosine kinases) و گیرنده‌های G-پروتئین فعال می‌شود (۱۰). در صورت فعال شدن این مسیر، سایکلین D-1 (Cyclin D1) که یکی از اهداف این مسیر است فعال شده و با اتصال به پروتئین‌های کیناز وابسته به چرخه (CDKs, Cyclin-Dependent kinases) باعث پیشرفت نقطه بازرسی G1/S و در نهایت تکثیر سلول‌ها می‌شود (۱۱).

در این مطالعه محیط ITS و کوچک مولکول CHIR99021 در تکوین جنین‌های متوقف شده نوع یک تا مرحله بلاستوسیست، شایستگی بیشتری را نشان دادند. محیط ITS از ترکیب انسولین، ترانسفرین و سلنیوم ساخته شده است. از مهم‌ترین دلایلی که این محیط را قادر به خروج جنین‌ها از حالت توقف کرده است، احتمالاً می‌توان به حضور انسولین اشاره کرد. گیرنده‌های انسولین در جنین‌های پیش از لانه‌گزینی، از مرحله یک سلولی فعال هستند (۱۲). وجود رونوشت گیرنده‌های فاکتور رشد شبه انسولین ۱ و ۲ (IGFR1/2, Insulin-Like Growth Factor Receptor 1/2) و رونوشت گیرنده انسولین (IR, Insulin Receptor) در تخمک و جنین پیش از لانه‌گزینی به اثبات رسیده است. شواهدی نیز مبنی بر تنظیم تکوین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی توسط انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین مترشح از منابع مادری یا جنینی وجود دارد (۱۳). IGF1 (Insulin-Like Growth Factor 1) باعث افزایش سریع سطح پروتئین‌های سایکلین D-1، سایکلین D-۳ و سایکلین E می‌شود. از طرفی باعث کاهش

سطوح بیان P27 و P57 (مهارکننده‌های چرخه سلولی) می‌شود (۱۴). همچنین مشخص شده است که پس از تیمار جنین‌های موشی با انسولین، IGF1 و IGF2 (Insulin-Like Growth Factor 1)، افزایش سنتز پروتئین و تعداد سلول‌ها مشاهده شده است (۱۳).

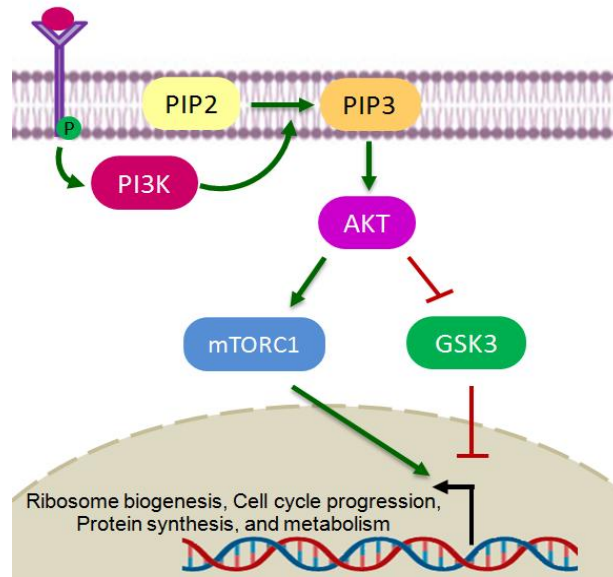
محیط E8 که تا حدودی در تکوین جنین‌های متوقف شده تا مرحله پیش از مورولا موفق عمل کرد، شامل انسولین، ترانسفرین و سدیم سلنیوم می‌باشد (یعنی محیط ITS را هم در ترکیبات خود دارد)؛ اما دلیل این که نسبت به ITS عملکرد کمتری داشت، احتمالاً به دلیل وجود فاکتور رشد تغییر دهنده بتا (β -Transforming Growth Factor, TGF- β) است. TGF- β به وسیله مهار ژن‌های مربوط به cdk، باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G1 می‌شود. همچنین c-Myc که باعث افزایش سطح سایکلین D می‌شود، نیز توسط TGF- β سرکوب می‌شود. از سوی دیگر تحریک سلول‌ها توسط TGF- β باعث تبدیل فرم فعال CDK به حالت غیرفعال می‌شود (۱۵).

احتمالاً کوچک مولکول CHIR99021، از طریق مهار GSK3 (Glycogen synthase kinase 3)، مسیر PI3K را فعال می‌کند. این مهار باعث می‌شود که اثر مهار GSK3 از روی WNT برداشته شده و از تجزیه بتا-کتینین در سیتوپلاسم جلوگیری شود و در نتیجه بتا-کتینین قادر به ورود به هسته و بیان ژن‌های هدف WNT خواهد بود (۱۶).

با توجه به نتایج فوق میتوان گفت که تحریک مسیر PI3K به وسیله CHIR99021 و ITS می‌تواند منجر به خروج جنین‌ها از حالت توقف شود. در این مطالعه به جنین‌های نوع یک متوقف‌شده دسترسی محدودی وجود داشت. با این حال به نظر می‌رسد که تحریک مسیر PI3K به وسیله ITS و CHIR99021 می‌تواند نتایج امیدوار کننده‌ای را در از سرگیری تکوین جنین‌های متوقف‌شده داشته باشد. اما این جنین‌ها باید از نظر فاکتورهای مرتبط با پرتوانی و چرخه سلولی نیز بررسی شوند تا تاثیرات تحریک این مسیر به طور کامل مشخص شود.

۶- نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که بعضی از جنین‌های متوقف‌شده را می‌توان به وسیله تیمار با ITS، CHIR99021 و E8 از حالت توقف خارج کرد. این مواد قادر به تحریک مسیر PI3K هستند و می‌توانند بر خروج جنین‌های متوقف‌شده، تاثیر معنیداری داشته باشند. ساز و کار عملکرد ITS و E8 به احتمال از طریق انسولین موجود در محیط است که با اتصال به گیرنده خود به صورت مستقیم با فعال سازی PI3K باعث فعال شدن این مسیر می‌شوند. اما CHIR99021 به صورت غیر مستقیم، از طریق فعال کردن WNT به واسطه مهار GSK3، مسیر PI3K را فعال می‌کند (شکل ۵).



شکل ۵: مکانیسم عمل مسیر پیام‌رسانی PI3K: بعد از فسفریله شدن گیرنده به‌واسطه اتصال لیگاند به آن، PI3K فعال شده و باعث تبدیل PIP2 به PIP3 می‌شود. سپس AKT فعال می‌شود و بواسطه فعال کردن mTORC1 و مهار GSK3 باعث تحریک بیوزنز ریبوزوم، پیشرفت چرخه سلولی، سنتز پروتئین و تنظیم متابولیسم می‌شود. (طراحی شده توسط نرگس کرامی توسط Biorender.com)

۷- تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه خانم نرگس کرامی با شماره طرح ۴۰۱۰۰۰۲۸۶ انجام‌شده در پژوهشگاه رویان تهران می‌باشد.

۸- منابع

1. Anwar S, Anwar A. Infertility: A review on causes, treatment and management. *Womens Health Gynecol.* 2016;5:2-5.
2. Xu Y, Shi Y, Fu J, Yu M, Feng R, Sang Q, et al. Mutations in PADI6 cause female infertility characterized by early embryonic arrest. *The American Journal of Human Genetics.* 2016;99(3):744-52.
3. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human reproduction.* 2000;15(12):2634-43.
4. Mohebi M, Ghafouri-Fard S. Embryo developmental arrest: Review of genetic factors and pathways. *Gene Reports.* 2019;17:100479.
5. Karami N, Hassani F, Eftekhari-Yazdi P, Taei A, Hassani S. Evaluation of the causes of pre-implantation developmental arrest and ways to overcome it. *Cell and Tissue Journal.* 2023;14(2):141-59.
6. Yang Y, Shi L, Fu X, Ma G, Yang Z, Li Y, et al. Human embryos arrest in a quiescent-like state characterized by metabolic and zygotic genome activation problems. *bioRxiv.* 2021:2021.12. 19.473390.
7. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell.* 2017;170(4):605-35.
8. De Felici M, Klinger FG. PI3K/PTEN/AKT signaling pathways in germ cell development and their involvement in germ cell tumors and ovarian dysfunctions. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(18):9838.

9. Madsen RR. PI3K in stemness regulation: from development to cancer. *Biochemical Society Transactions*. 2020;48(1):301-15.
10. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular cancer*. 2019;18(1):1-28.
11. Zhao M, Ramaswamy B. Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. *World journal of clinical oncology*. 2014;5(3):248.
12. Riley JK, Carayannopoulos MO, Wyman AH, Chi M, Ratajczak CK, Moley KH. The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology*. 2005;284(2):377-86.
13. Lighten AD, Hardy K, Winston RM, Moore GE. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 1997;47(2):134-9.
14. Mairet-Coello G, Tury A, DiCicco-Bloom E. Insulin-like growth factor-1 promotes G1/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(3):775-88.
15. Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massagué J. Myc downregulation by transforming growth factor β required for activation of the p15Ink4b G1 arrest pathway. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(9):5913-22.
16. Thompson M, Nejak-Bowen K, Monga SP. Crosstalk of the Wnt signaling pathway. *Targeting the Wnt Pathway in Cancer*. 2011:51-80.