Research Article
Nova Biologica Reperta 8(1): 31-38 (2021)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.1.31

مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۸، شماره ۱، صفحات ۳۱ الی ۳۸ (۱۴۰۰)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی اپیتلیالی تخمدان انسانی بر ترشح هورمون‌های AMH و Inhibin سلول‌های گرانولوزا

نجمه نیکدل[۱]، جواد بهارآرا[۱،۲]، سعید ذاکر بستان‌آباد[۳]، مریم طهرانی‌پور[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران؛ [۳]گروه میکروب شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: جواد بهارآرا، baharara@mshdiau.ac.ir

چکیده. اگزوزوم از انواع مختلف سلول‌ها ترشح می‌شود و به‌عنوان بسته‌های زیستی شناخته می‌شوند. اگزوزوم‌ها در ارتباطات بین سلولی و همچنین در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های مختلف از جمله سرطان نقش مهمی دارند. هورمون‌های Inhibin و آنتی‌مولرین هورمون (AMH) از نشانگرهای تومور سلول گرانولوزا (GCT) است. در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان تخمدان انسانی بر ترشح هورمون Inhibin B و AMH از سلول-های گرانولوزا بررسی شد. ابتدا سلول‌های رده A2780 سرطان تخمدان کشت داده شدند سپس مایع رویی جهت استخراج اگزوزوم‌ها توسط اولتراسانتریفیوژ جمع‌آوری و با استفاده از روش DLS و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شدند. همچنین سلول‌های گرانولوزا از تخمدان موش ماده نابالغ نژاد Balb/C استخراج و کشت داده شد و سپس توسط غلظت ۲۵ µg/ml از اگزوزوم‌های استخراج شده سلول‌های سرطان تخمدان تیمار شد و مقدار هورمون‌های Inhibin B و AMH اندازه‌گیری شد. مقدار هورمون‌های Inhibin B و AMH در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد P<۰/۰۵. از آنجا که در این مطالعه اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول های سرطانی تخمدان باعث افزایش معنی‌دار هورمون‌های Inhibin B و AMH شده است به‌نظر می‌رسد که در ایجاد تومور سلول گرانولوزا موثر می‌باشند و لذا ضرورت مطالعات کلینیکی کاملا محسوس و پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی. اگزوزوم، اولتراسانتریفیوژ، تومور سلول گرانولوزا، Inhibin B، AMH

The effect of exosomes derived from human ovarian epithelial cancer cells on the secretion of AMH and Inhibin in granulosa cells

Najme Nikdel[1], Javad Baharara[1,2], Saeed Zakerbostanabad[3] & Maryam Tehranipour[1]
[1]Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran; [2]Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran; [3]Department of Microbiology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Corresponding author: Javad Baharara, baharara@mshdiau.ac.ir

Abstract. Exosomes are secreted by different types of cells and known as biological packages. Exosomes have significant role in intercellular communications and involved in the development and progression of various diseases such as cancer. Inhibin B and anti-mullerian hormone (AMH) are markers of granulosa cell tumors (GCT) and due to the role of exosomes in the progression of cancer, in this experimental study, the effect of exosomes derived from human ovarian cancer cells on the secretion of Inhibin B and antimullerian hormone (AMH) by granulosa cells was investigated. First, A2780 human ovarian cancer cells were cultured, then the supernatant was collected to extract the exosomes by ultracentrifugation and subsequently, the extracted exosomes were checked out using dynamic light scattering (DLS) and Scanning electron microscopy (SEM). In addition, granulosa cells were isolated and cultured from the ovaries immature female Balb / C mice and treated with 25 µg/ml of exosomes derived from the ovarian cancer cell-line. Inhibin B and AMH hormones levels were then measured. The results showed the significant (P<0/05) increase of the level of inhibin B and AMH hormones in the treated cells in comparison with the control group. According to the results, exosomes increased the secretion of Inhibin B and AMH hormones and seems to be effective in the proliferation of granulosa cell tumors.

Key words. exosome, ultracentrifugation, granulosa cell tumor, inhibin B, AMH

Received 22.09.2020/ Revised 22.10.2020/ Accepted 01.11.2020/ Published 10.06.2020
دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱/ اصلاح: ۱۳۹۹/۰۸/۰۱/ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۱/ انتشار: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]

مقدمه

مطالعات متعدد نشان داده است که ریز محیط اطراف در سرطانی شدن و کسب فنوتیپ متاستازی در سلول‌های سالم دخالت دارند و دیالوگ در محل تومور اولیه، و همچنین در مکان های دوردست، از طریق بسیاری از عوامل ترشحی از جمله اگزوزوم انجام می‌شود (parisse et al., 2017). اگزوزوم وزیکول‌های خارج سلولی ترشح شده کوچک با قطر ۳۰–۱۵۰ نانومتر هستند که از انواع مختلف سلول‌ها ترشح می‌شوند (Stefanius et al., 2019) و به‌عنوان مثال در زیست‌شناسی سرطان با افزایش بقا و رشد سلول‌های تومور، کمک و تسهیل تهاجم و متاستاز، پیش‌برد آنژیوژنز، مهاجرت و ممانعت از آپوپتوز، نقش دارند (Franzen et al., 2015).

گزارشات سازمان بهداشت جهانی (WHO) همچنان از قرار-گیری سرطان به‌عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی عروقی حکایت دارد (Meimandi and Yaghoobi 2019). سرطان تخمدان نیز یک تومور بدخیم مربوط به دستگاه تولیدمثل ماده می‌باشد که در بین زنان دومین بدخیمی و سومین سرطان شایع در میان انواع سرطان‌ها است و هم‌چنین در بین تومورهای زنان بیشترین میزان مرگ‌ومیر را داراست (Zhu et al., 2016; Amini et al., 2015) و پژوهش‌های فراوانی در ارتباط با درمان و جلوگیری از گسترش این بیماری صورت گرفته است از جمله در سال ۲۰۱۹ اثر نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره گیاه بومادران بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان بررسی شد (Baharara et al., 2019).

اما شایع‌ترین تومور طناب استرومای جنسی که از سلول‌های گرانولوزا ناشی می‌شود و بسیار نادر است و در سال‌های اخیر شاهد افزایش آن هستیم تومور سلول گرانولوزا (GCT) است که تقریبا از هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر احتمال ابتلا به این سرطان در حدود ۰/۴۷ تا ۱/۶ مورد می‌باشد. این نوع سرطان به دو گروه تقسیم می‌شود که یکی تومور سلول گرانولوزای بالغ (AGCT) و دیگری تومور سلول گرانولوزای جوان (JGCT) و همچنین مشخص شده که این تومور می‌تواند باعث بلوغ زودرس، آمنوره و ناباروری و یا متوراژی شود (Hasanzadehmofrad et al., 2012; Li et al., 2018). با توجه به میزان بالای عود و مرگ‌ومیر در تومور سلول گرانولوزا نسبت به میزان شیوع آن، بنابراین ایجاد درمان-های موثر بر پایه نشانگرهای تشخیص زودرس برای تومور مذکور از اهمیت بالایی برخوردار است (Kim et al., 2016).

آنتی‌مولرین هورمون (AMH) یک گلیکوپروتئین دیمری عضو خانواده فاکتورهای رشد انتقالی (TGF) می‌باشدکه در تخمدان توسط سلولهای گرانولوزای فولیکول های آنترال و پره‌آنترال تولید می‌شود و نقش آن مهار شروع به رشد فولیکول‌های Primordial و همین‌طور مهار ادامه رشد و تکامل فولیکول‌های پره‌آنترال تحت القاء FSH می‌باشد، اما در افراد دارای GCT سطح سرمی AMH بسیار بالا است (Marca & Volpe, 2007).

با توجه به اینکه هورمون‌های پپتیدی در سرم افراد قابل اندازه‌گیری است، بر این اساس یکی از موارد قابل بررسی هورمون Inhibin B است که با توجه به غلظت بالای آن در افراد مبتلا به GCT، می‌تواند به‌عنوان مارکر شاخص در تشخیص زودهنگام GCT کاربرد داشته باشد (Mom et al., 2007; Lappohn et al., 1989). Inhibin یک عضو از خانواده TGF-β است که توسط سلول‌های گرانولوزای فولیکول در حال رشد تولید می‌شود و از یک زیر واحد α تشکیل شده است که به یک زیر واحد βA یا βB متصل می‌شود و Inhibin A و Inhibin B را تشکیل می‌دهد (Mom et al., 2007).

بدین ترتیب با توجه به مشکلات ناشی از تومور سلول گرانولوزا در بین زنان در این پژوهش اثر اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های سرطان تخمدان بر میزان ترشح هورمون‌های AMH و Inhibin B گرانولوزایی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

استخراج اگزوزوم

ابتدا سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 را کشت داده و بعد از گذشت زمان مناسب و رسیدن تراکم سلولی به ۷۰ الی ۸۰ درصد محیط رویی برداشته شد و با محیط RPMI 1640 با ۱۰ درصد FBS فاقد اگزوزوم که توسط اولتراسانتریفیوژ عاری از هر-گونه پروتئین گردید، تعویض شدند و بعد از گذشت ۴۸ ساعت محیط رویی جمع‌آوری و ابتدا با دور g ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت و مایع رویی جمع‌آوری و به مدت ۳۰ دقیقه در دور g ۱۶۵۰۰ سانتریفیوژ انجام پذیرفت و به دنبال آن محلول رویی، از فیلتر µm ۰/۲۲ عبور داده شد. در انتها مایع جمع‌آوری شده به‌منظور استخراج اگزوزوم با دور g ۱۰۰۰۰۰ به مدت ۷۰ دقیقه برای دو بار اولتراسانتریفیوژ بر روی آن صورت گرفت و اگزوزوم به‌دست آمده با PBS سوسپانس گردید و با استفاده از کیت BCA (شرکت کیا زیست، ایران) تعیین غلظت گردید (Zhang et al., 2015).

شناسایی اگزوزوم توسط روش DLS

اندازه‌گیری سریع و ساده توسط روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) از روش‌های غیر تصویربرداری هستند که برای شناسایی اگزوزوم مورد استفاده قرار می‌گیرد. تمام آزمایشات در رقت‌های

۱: ۱۰۰۰ انجام و توسط دستگاه Zetasizer صورت گرفت (Sharma et al., 2018).

شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی

شناسایی اگزوزوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، پس از استخراج اگزوزوم‌ها، با استفاده از گلوتارآلدئید ۳/۷ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ثابت شدند. سپس با استفاده از PBS شست‌وشو داده شدند و به دنبال آن آب‌گیری با اتانول صورت گرفت. نمونه‌ها روی یک بستر شیشه‌ای قرار گرفتند و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد خشک شدند و با استفاده از میکروسکوپ SEM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (Sokolova et al., 2011).

کشت سلول های گرانولوزا

موش‌های ماده نابالغ Balb /C ۲۱ الی ۳۰ روزه با تزریق داخل صفاقی ۷ واحد گنادوتروپین حاملگی مادیان تحریک شدند (Monsefi et al., 2017). مجوز اخلاقی این مطالعه از کمیته اخلاق تحقیقات زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد به شماره IR.IAU.MSHD.REC.1398.097 گرفته شده است. ۴۸ ساعت بعد حیوانات با دررفتگی مهره گردنی کشته شدند. سپس، تخمدان‌ها درون ظرف پتری با DMEM / F12 همراه با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین قرار گرفتند. تخمدان‌ها توسط سوزن ۲۵ سوراخ شدند و سوسپانسیون سلولی پیپتاژ گردید و سلول‌های گرانولوزا آزاد شدند. سپس، سوسپانسیون سلول‌های گرانولوزا سانتریفیوژ شدند (۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه)، مجددا در DMEM / F12 معلق و کشت شدند (Monsefi et al., 2017).

اندازه گیری هورمون AMH

سلول های گرانولوزا در محیط کشت DMEM- F12 در یک پلیت ۲۴ خانه به تعداد ۵×۱۰^۵ به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. سپس محیط کشت با یک محیط کشت تازه حاوی غلظت µg/ml ۲۵ از اگزوزوم عوض شدند و به‌مدت ۱ و ۸ روز کشت شدند. محیط رویی نهایی جمع‌آوری شد و سطوح AMH با استفاده از کیت انسانی توسط روش ELISA اندازه‌گیری شد (Ding et al., 2012).

اندازه‌گیری هورمون Inhibin B

برای اندازه‌گیری هورمون Inhibin B محیط رویی نهایی کشت سلول‌های گرانولوزا کشت داده شده در یک پلیت ۲۴ خانه با تعداد ۵×۱۰^۵ سلول پس از گذشت زمان‌های ۱ و ۸ روز که با غلظت µg/ml ۲۵ از اگزوزوم تیمار شده بودند جمع-آوری شد و جهت اندازه‌گیری هورمون Inhibin B روش ELISA با استفاده از کیت انسانی AnshLabs ساخت USA مورد استفاده قرار گرفت (Ding et al., 2012 Hasanzadehmofrad et al., 2012).

آنالیز آماری

آنالیز آماری توسط نرم افزار Prism، آزمون t test به منظور مقایسه ی داده‌ها صورت گرفت و سطح $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مورفولوژی سلول‌های گرانولوزا

مورفولوژی سلول‌های گرانولوزای استخراج شده از موش نابالغ نژاد Balb/C در شکل ۱ نشان داده شده است که سلول‌ها به صورت ستاره‌ای و هسته بیضی شکل است.

شناسایی اگزوزوم

تراکم و اندازه اگزوزوم‌های مشتق و خالص شده از سلول‌های A2780 توسط روش DLS و SEM بررسی شدند. نتایج در شکل ۱ ارائه شده است و نتایج بر اساس روش DLS مشخص شد که بیشترین تراکم اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های رده A2780 اندازه‌ای بین ۷۰ الی ۸۰ نانومتر را دارا بودند (شکل ۲- A). بررسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که قطر اگزوزوم‌ها از ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر بود (شکل ۲- B).

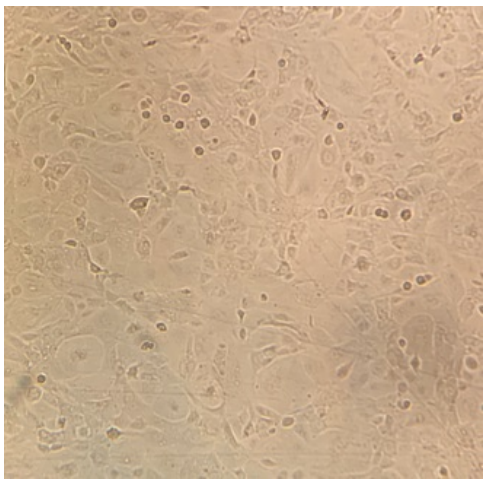
هورمون AMH

به منظور بررسی اثرات اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 بر ترشح AMH توسط سلول‌های گرانولوزا، روش ELISA مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد در روز ۱ در گروه تیمار با غلظت µg/ml ۲۵ از اگزوزوم مشتق از سلول‌های سرطانی رده A2780 در مقایسه با کنترل، افزایش غلظت ترشح هورمون AMH صورت گرفته است که این افزایش در سطح $P<0.05$ معنی‌دار بود. همچنین غلظت این هورمون بعد از گذشت ۸ روز از تیمار سلول‌های گرانولوزا توسط غلظت µg/ml ۲۵ از اگزوزوم مشتق از سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 نسبت به گروه کنترل افزایش یافت و در سطح $P<0.01$ معنی‌دار بود.

هورمون Inhibin B

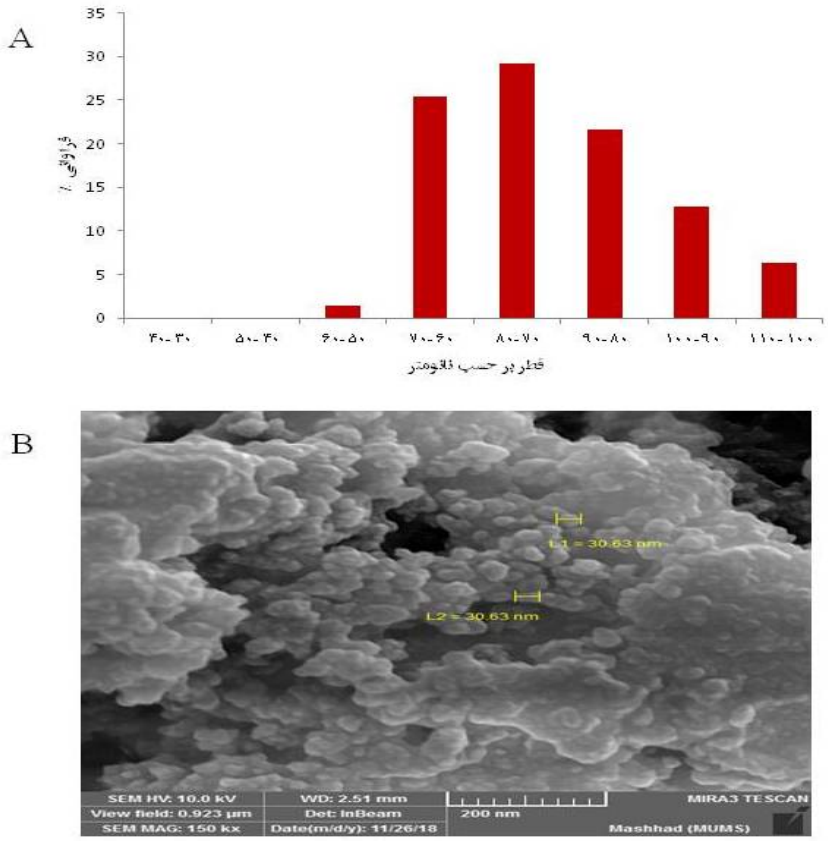
اندازه‌گیری میزان ترشح هورمون Inhibin B در سلول‌های گرانولوزای تیمار شده توسط غلظت µg/ml ۲۵ از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 با استفاده از روش ELISA نشان داد که تیمار سلول های گرانولوزا با غلظت 25 µg/ml از اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های رده‌ی A2780 سرطان تخمدان انسانی موجب افزایش قابل توجهی در میزان ترشح هورمون Inhibin B در روزهای ۱ و ۸ نسبت به کنترل می‌شود که این افزایش به ترتیب در سطح $P<0.05$ و $P<0.001$ معنی‌دار است.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]



شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های گرانولوزا (بزرگنمایی ×۱۰۰).

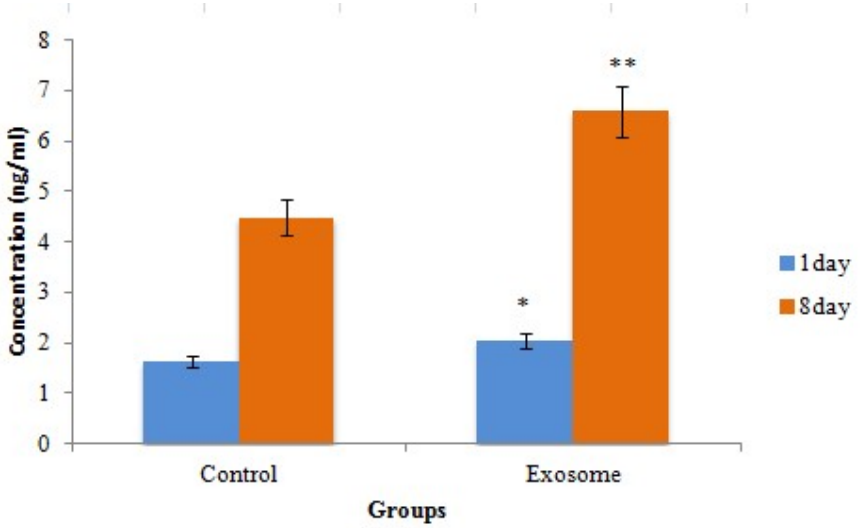
Figure 1. The morphology of granulosa cells (Magnification × 100).



شکل ۲- اگزوزوم‌ها از سلول‌های A2780 استخراج شدند و **A.** با استفاده از روش DLS ارزیابی شد و همچنین **B.** تحت میکروسکوپ الکترونی روبشی شناسایی شد.

Figure 2. Exosomes isolated from A2780 cells **A.** under evaluation with DLS method **B.** Micrographs by scanning electron microscopy.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]



شکل ۳- اگزوزوم (25 µg/ml) تولید AMH را در سلول‌های گرانولوزا افزایش داد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار در سه آزمایش زیستی مستقل ارائه شده است (دو گروه) (*P < 0.05, **P< 0.01).

Figure 3. The increase of AMH production in granulosa cells by Exosome (25 µg/ml). The data were presented as the mean ± SD of three independent experiments (two groups) (*P < 0.05, **P< 0.01)

بحث

رایج‌ترین روش در درمان تومور سلول گرانولوزا برداشتن تخمدان به همراه تومور است، در نتیجه این جراحی در پاره‌ای از موارد که تومور هر دو تخمدان را درگیر کرده باشد به‌علت برداشتن تخمدان‌ها ناباروری ایجاد می‌شود پس در مسئله باروری نیز این تومور بسیار حائز اهمیت است لذا توجه به مارکرهای تشخیصی زود هنگام از جمله هورمون Inhibin B و AMH بسیار ضروری است (Phyoe-battaglia et al., 2018; Mom et al., 2007).

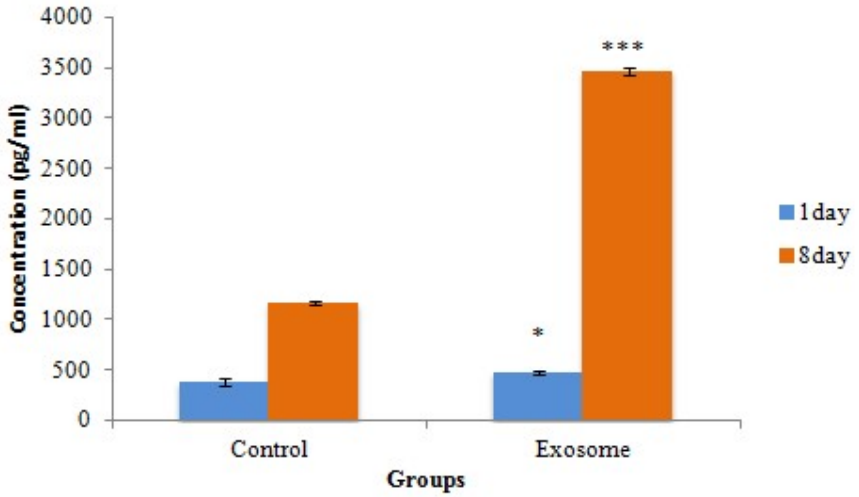
اگزوزوم با دارا بودن انواعی از پروتئین‌ها، MRNA ها، Micro RNA ها، حتی قطعات DNA و فاکتورهای رشد بی‌شمار می‌تواند در بسیاری از فرایندهای سلولی، ارتباطات سلول با سلول و حتی در ایجاد و پیشرفت بیماری نقش داشته باشد. مجموعه‌ای از شواهد بدست آمده توسط تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که اگزوزوم‌ها، در شکل‌دهی به ریزمحیط تومور برای پیشبرد سرطان بر پایه متاستاز تومور، بسیار مهم هستند همچنین مطالعات نشان داده است که اگزوزوم‌ها می‌توانند در تومورزایی سلول‌های نرمال نقش ایفا کنند (Stefanius et al., 2019).

در سال ۲۰۱۰ Van der pol و همکاران برای شناسایی اگزوزوم از روش DLS استفاده نمودند و نشان دادند که اگزوزوم اندازه‌ای بین ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر دارد و نتایج پژوهش حاضر با استفاده از روش DLS که بیشترین تراکم ذره‌های استخراج شده از مایع رویی سلول‌های سرطان رده A2780 بین ۷۰ الی ۸۰ نانومتر است، حضور اگزوزوم را تایید نمود که هم راستا با مطالعه ذکر شده، است (Van Der Pol et al., 2010). همچنین Chuo و همکاران بیان داشتند که استفاده از میکروسکوپ الکترونی یکی از روش‌های مهم در شناسایی اگزوزوم است (Chuo et al., 2018) و همچنین نتایج مطالعه بر روی اگزوزوم‌های مشتق از جفت توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد که قطر اگزوزوم‌های کمتر از ۱۰۰ بررسی حاضر نیز همسو با مطالعات قبلی است (Peak et al., 2018) و مشخص شد که قطر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان تخمدان زیر ۱۰۰ نانومتر است.

مطالعات نشان داده است که تومور سلول گرانولوزا دارای انواع مختلفی از نظر ظاهر است به همین دلیل در سونوگرافی ترانس واژینال امکان اشتباه با آندومتریومای تخمدان وجود دارد، به همین دلیل در مطالعات قبل بهمحض مشاهده توده تخمدان سطح سرمی هورمون AMH را مورد ارزیابی قرار دادند و متوجه شدند که در افراد مبتلا به GCT افزایش سطح سرم AMH رخ داده است (Phyoe-battaglia et al., 2018). مطالعه حاضر نیز هم سو با مطالعه ذکر شده، است و در سلول‌های تیمار شده با غلظت µg/ml ۲۵ از اگزوزوم افزایش سطح AMH مشاهده گردید.

همچنین با توجه به پیشرفت در نقش فیزیولوژیکی AMH در سال‌های اخیر، علاقه برای اهمیت دادن AMH به‌عنوان نشانگر تشخیصی افزایش یافته است و نشان داده شده است که AMH نشانگر خوبی در گردش خون برای تشخیص GCT است و در بیماران

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]



شکل ۴- اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان تخمدان بر ترشح اینهیبین در سلول‌های گرانولوزا. سلول‌های گرانولوزا در روز ۱ و ۸ کشت مقادیر بالاتر قابل توجهی اینهیبین در گروه 25 µg/ml اگزوزوم تولید کردند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیارارائه شد. مقادیر نسبت به گروه‌های کنترل به طور قابل ملاحظه ای (* P-value < 0.05, *** P-value < 0.001) متفاوت بود.

Figure 4. Effect of ovarian cancer cell-derived exosomes on regulating apoptosis in GCs cells. GCs produced significantly higher amounts of Inhibin B in the exosome 25 µg/ml group on the 8th day of culture. Data were presented as mean±SD. The values were significantly different (* P-value < 0.05, *** P-value < 0.001) in comparison with the controls.

.

دارای GCT سطح سرمی این هورمون افزایش می‌یابد، همچنین عنوان شد که AMH و inhibin از درجه بالاتری از حساسیت نسبت به استرادیول در GCT برخوردارند به دلیل اینکه تولید استرادیول در افراد GCT به‌طور گسترده‌ای متغیر است (Marca & Volpe, 2007)، که در پژوهش اخیر نیز مشابه با پژوهش La Marca و Volpe سطح AMH و Inhibin B در گروه تیماری نسبت به گروه شاهد که اگزوزوم دریافت نکرده بودند افزایش یافت.

در سال ۱۹۹۳ در مطالعه‌ای بیان شد که، افزایش ترشح AMH فقط در تومورهای استرومایی بند ناف جنسی رخ می‌دهد، و با توجه به اینکه GCT تومور استرومایی- بند ناف جنسی است پس شاخص خوبی برای تشخص این بیماری محسوب می‌شود (Healy et al., 1993) که در مطالعه حاضر نیز این هورمون مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد هم‌سو با مطالعات قبلی در بررسی حاضر در سلول‌های تحت تیمار با اگزوزوم مشتق از سرطان تخمدان در غلظت µg/ml ۲۵ شاهد افزایش ترشح هورمون AMH هستیم.

افزایش سطح AMH و Inhibin B می‌تواند به‌عنوان مارکر تومور مورد استفاده قرار گیرد که این موضوع درمطالعات قبل بیان شده است (Geerts et al., 2009) و در مطالعه‌ی حاضر با تیمار سلول‌ها توسط اگزوزوم سطح ترشح دو هورمون AMH و Inhibin B افزایش یافت و نشان دهنده‌ی تایید استفاده از این دو هورمون به‌عنوان مارکر تومور سلول گرانولوزا است.

همچنین محققان عنوان کردند در صورتی‌که افزایش AMH صورت بگیردو فرد دچار سندروم تخمدان پلی‌کیستیک نباشد حتما باید به وجود تومور در سلول‌های گرانولوزا شک کرد و برای تایید آن انجام MRI و تعیین سطح سرمی Inhibin B لازم است (Phyoe-battaglia et al., 2018) و در مطالعه‌ای عنوان شد که در ۹۰ درصد از اسب‌های دارای تومور سلول گرانولوزا افزایش ترشح Inhibin B صورت می‌گیرد (Mccue et al., 2006) و در مطالعه حاضر نیز تیمار سلول‌های گرانولوزا با اگزوزوم مشتق از سرطان تخمدان منجر به افزایش ترشح هورمون Inhibin B نسبت به سلول‌های شاهد که تحت تیمار قرار نگرفتند، شد.

در سال ۲۰۱۶ به بررسی پروتئین اپیدیدیم انسانی ۴ (HE4) ، آنتی‌ژن کربوهیدرات ۱۲۵ (CA125) ، AMH و Inhibin B در بیماران مبتلا به GCT پرداختند و متوجه شدند که سطح HE4 و CA125 در تومور سلول گرانولوزا پایین بود درحالی‌که سطح Inhibin B و AMH در بیماران با GCT افزایش یافته است و عنوان داشتند با توجه به اینکه Inhibin B و AMH عملکرد مشابهی دارند، ترکیبی از Inhibin B و AMH باعث افزایش دقت در تشخیص در مقایسه با هر یک از مارکرها به تنهایی می-

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]

شود (Haltia et al., 2016) و در بررسی حاضر نیز ترشح هورمون‌های AMH و Inhbin B در سلول‌های تیماری افزایش یافته است.

با توجه به میزان بالای عود و مرگ‌ومیر در تومور سلول گرانولوزا و تاثیر این بیماری بر باروری و همچنین با توجه به موضوع گسترش سرطان در نتیجه کاربرد اگزوزوم‌ها، شناسایی و درمان زود هنگام تومور سلول گرانولوزا بسیار اهمیت دارد که در پژوهش حاضر نشان داده شد که با تیمار سلول‌های گرانولوزا با اگزوزوم‌های مترشحه از سلول‌های سرطان تخمدان، افزایش معنی‌دار هورمون‌های Inhibin B و AMH گرانولوزایی رخ داده است لذا می‌توان احتمال داد از آنجایی‌که سرطان تخمدان بر سلول‌های گرانولوزای اطراف خود موثر می‌باشد در ایجاد تومور سلول گرانولوزا نیز می‌تواند نقش داشته باشد بدیهی است در این راستا مطالعات بیشتر به‌ویژه ارزیابی‌های کلینیکی کاملا ضرورت دارد.

سپاسگزاری

این تحقیق مصوب به شماره ۱۶۹۶۵ در مرکز تحقیقات بیولوژی کابردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شده است. نویسندگان برخود لازم می‌دانند ازکلیه کارشناسان مرکز تحقیقات سپاسگزاری نمایند.

REFERENCES

Amini, E., Baharara, J., Nikdel, N., & Salek Abdollahi, F. 2015. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of honey bee venom and chrysin on human ovarian cancer cells. Asia Pacific Journal of Medical Toxicology 4: 68-73.

Baharara J., Ramezani T., Saghiri N. & Salek F. 2019. Investigating the apoptotic effects of silver nanoparticles coated with Achillea biebersteinii extract on A2780 ovarian cancer cells. Nova Biologica Reperta 6: 140-147

Chuo, S.T., Chien, J.C. & Lai, C.P. 2018. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. Journal of Biomedical Science 25: 1-10.

Ding, T., Luo, A., Yang, S., Lai, Z., Wang, Y., Shen, W., Jiang, J., Lu, Y., Ma, D. & Wang, S. 2012. Effects of basal media and supplements on diethylstilbestrol-treated immature mouse primary granulosa cell growth and regulation of steroidogenesis *in vitro*. Reproduction in Domestic Animals 47: 355-364.

Franzen C.A., Blackwell R.H., Todorovic V., Greco K.A., Foreman K.E., Flanigan R.C., Kuo PC. & Gupta G.N. 2015. Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. Oncogenesis 4: 151-163.

Geerts I., Vergote I., Neven P., & Billen J. 2009. The role of inhibins B and antimüllerian hormone for diagnosis and follow-up of granulosa cell tumors. International Journal of Gynecological Cancer 19: 847-55.

Haltia U.M, Hallamaa M., Tapper J., Hynninen J., Alfthan H., Kalra B., Ritvos O., Heikinheimo M., Unkila-Kallio L., Perheentupa A. & Färkkilä A. 2017. Roles of human epididymis protein 4, carbohydrate antigen 125, inhibin B and anti-Müllerian hormone in the differential diagnosis and follow-up of ovarian granulosa cell tumors. Gynecologic Oncology 144: 83-89.

Hasanzadeh Mofrad, M., Hosseini Hoshyar A.S., Ghazanfari SM. & Boroumand Noghabi S. 2012. 'Granulosa cell tumor associated with chondrosarcoma of iliac: A case report. Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 19: 304-309.

Healy, D.L., Burger H., Mamers P., Jobling T., Bangah M. & Quinn M. 1993. 'Elevated serum Inhibin concentrations in postmenopausal women with ovarian tumors'. The New England Journal of Medicine 329: 1539-1542.

Kim, S.-Y., Ebbert, K., H. Cordeiro, M., Romero, M.M., Whelan, K.A. Suarez, A.A., Woodruff, T.K. & Kurita, T. 2016. Constitutive activation of PI3K in aocyte induces ovarian granulosa cell tumors. Cancer Research 76: 3851-3861.

Li, J., Bao R., Peng, S., & Zhang, C. 2018. The molecular mechanism of ovarian granulosa cell tumors. Journal of Ovarian Research 11: 1-13.

Lappöhn, R.E. & Burger, H.G. 1989. Bouma, J., Bangah, M., Krans, M. & de Bruijn, H.W. Inhibin as a marker for granulosa-cell tumors. The New England Journal of Medicine 21: 790-3.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]

La Marca A. & Volpe A. 2007. The Anti-Mullerian hormone and ovarian cancer. Human Reproduction Update 13: 265-273

McCue, P.M, Roser, J.F., Munro, C.J., Liu, I.K. & Lasley, B.L. 2006. Granulosa cell tumors of the equine ovary. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 22: 799-817.

Meimandi, K. & Yaghoobi, M.M. 2019. Effect of aqueous and ethanolic extracts of Sedum album L. on human stomach and breast carcinoma cell lines in vitro. Nova Biologica Reperta 6: 10-19

Mom, C.H., Engelen, M.J.A., Willemse, P.H.B., Gietema, J.A., ten Hoor, K.A., de Vries, E.G.E. & van der Zee, A.G.J. 2007. Granulosa cell tumors of the ovary: The clinical value of serum inhibin A and B levels in a large single center cohort. Gynecologic Oncology 105: 365-372

Monsefi, M., Nadi, A. & Alinejad, Z. 2017. The effects of Salvia officinalis L. on granulosa cells and in vitro maturation of oocytes in mice. International Journal of Reproductive BioMedicine 15: 649-660

Parisse, P., Rago, I., Ulloa Severino, L., Perissinotto, F., Ambrosetti, E., Paoletti, P., Ricci, M., Beltrami, A.P., Cesselli, D. & Casalis, L. 2017. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. European Biophysics Journal 46: 813-820.

Peak, T.C, Praharaj, P.P., Panigrahi, G.K., Doyle, M., Su, Y., Schlaepfer, I.R., Singh, R., Vander Griend, D.J., Alickson, J., Hemal, A., Atala, A. & Deep, G. 2018. Exosomes secreted by placental stem cells selectively inhibit growth of aggressive prostate cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 499: 1004-1010.

Phyoe-Battaglia, T., Bartels, C., Nulsen, J. & Grow, D.R. 2018. In vitro fertilization with granulosa cell tumor: a report of two cases. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 35: 1919-1921.

Sharma, S., LeClaire, M. & Gimzewski, J.K. 2018. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. Nanotechnology 29: 1-20.

Sokolova, V., Ludwig, A.K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P.A., Epple, M. & Giebel, B. 2011. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 87: 146-50.

Stefanius, K., Servage, K., Santos, M.D.S., Gray, H.F., E Toomb, J., Chimalapati S., Kim, M.S., Malladi, V.S., Brekken, R. & Orth, K. 2019. Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation. eLife 8: 1-26

Van der Pol, E., Hoekstra, A.G., Sturk, A., Otto, C., van Leeuwen, T.G. & Nieuwland, R. 2010. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. Journal of Thrombosis and Haemostasis 8: 2596-607.

Vanderfiyden, B C., Telfer, E.E. & Eppig, J.J. 1992. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. Biology of Reproduction 46, 1196-1204.

Wu, Y., Deng, W. & Klinke, D.J. 2015. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. Analyst 140: 6631-42.

Zhu, H., Yang, S.Y., Wang, J., Wang, L. & Han, S.Y. 2016. Evidence for miR-17-92 and miR-134 gene cluster regulation of ovarian cancer drug resistance. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 20: 25-31.

*****

How to cite this article:

Nikdel, N., Baharara, J., Zakerbostanabad, S. & Tehranipour, M. 2021. The effect of exosomes derived from human ovarian epithelial cancer cells on the secretion of AMH and Inhibin in granulosa cells. Nova Biologica Reperta 8: 31-38. (In Persian).

نیکدل، ن.، بهارآرا، ج.، ذاکر بستان‌آباد، س. و طهرانی‌پور، م. ۱۴۰۰. اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی اپیتلیالی تخمدان انسانی بر ترشح هورمون‌های AMH و Inhibin سلول های گرانولوزا. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۳۸-۳۱.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.15.4]

[DOI: 10.52547/nbr.8.1.31]