Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Expression of Apoptotic Genes after Autotransplantation of Vitrified Rat Ovary Encapsulated with Hyaluronic Acid Hydrogel

Maryam Akhavantaheri[1], Mojtaba Rezazadeh valojerdi [2,3*], Bita Ebrahimi[3]

[1]Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[2]Dept of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Dept of Embryology, Reproductive Biomedicine Institute, Royan Institute, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 05 December 2020
Revised: 20 December 2020
Accepted: 18 July 2021

**** Correspondence to:***
Mojtaba Rezazadehvalojerdi
Dept of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email mr-valojerdi@modares.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: Ischemia followed by apoptosis and follicles mortality are problems that occur after cryopreservation and ovarian tissue transplantation. The present study used hyaluronic acid hydrogel as a capsule to reduce ischemia and apoptosis in vitrified ovarian tissue transplantation of rats.
Material & Methods: In total, 22 adult female rats (~ 8-week old) with normal estrous cycle were ovariectomized, and their right ovaries were then vitrified and divided into two groups after being warmed, including vitrified-transplanted (VT) (n=11) and vitrified-encapsulated in hyaluronic acid hydrogel-transplanted (VT+HA) (n=11) that were auto transplanted into the dorsal muscle. Following that, a daily vaginal smear was obtained from the 4th day after transplantation of the rats. The ovaries were removed at the end of the first estrous cycle (approximately 15 days after transplantation), and some apoptotic genes including P53, c-Myc, Bax, Bcl-2, and Caspase 3 were evaluated by the real-time PCR.
Findings: All transplants were completely successful (100%). The results also showed that the expression of the P53, c-Myc, Bax, and Caspase 3 genes were higher in the VT group, compared to the VT+HA group. However, this difference was statistically significant only in the c-Myc gene ($P<0.05$).
Discussion & Conclusion: Hyaluronic acid hydrogel was able to reduce the rate of apoptosis in the capsule group (VT+HA), compared to the non-capsule group (VT) after transplantation.

Keywords: Apoptosis, Hyaluronic acid hydrogel, Ovarian tissue, Ovarian transplantation, Vitrification

➢ **How to cite this paper**

Akhavantaheri M, Rezazadehvalojerdi M, Ebrahimi B. Expression of Apoptotic Genes after Autotransplantation of Vitrified Rat Ovary Encapsulated with Hyaluronic Acid Hydrogel. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(5): 12-21.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

میزان بیان ژن‌های آپوپتوز پس از پیوند اتوگرافت بافت تخمدان انجمادی کپسوله‌شده با هیدروژل اسید هیالورونیک در رت

مریم اخوان طاهری[۱]، مجتبی رضازاده ولوجردی[۲،۳*]، بیتا ابراهیمی[۳]

[۱] مرکز تحقیقات تولید سلول‌های جنسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
[۲] گروه آناتومی، دانشکدهٔ علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۳] گروه جنین‌شناسی، پژوهشکدهٔ علوم تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵
تاریخ داوری: ۱۳۹۹/۰۹/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۷

نویسنده مسئول:
مجتبی رضازاده ولوجردی
گروه آناتومی، دانشکدهٔ علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
Email:
mr_valojerdi@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: ایسکمی و به دنبال آن، آپوپتوز و مرگ‌ومیر فولیکول‌ها از مشکلاتی است که پس از انجماد و پیوند بافت تخمدان رخ می‌دهد. در مطالعهٔ حاضر، با هدف کاهش ایسکمی و آپوپتوز، از هیدروژل اسید هیالورونیک به‌عنوان یک کپسول در بافت تخمدان انجمادی-پیوندی رت استفاده شد.

مواد و روش ها: ۲۲ رت مادهٔ بالغ (~۸ هفته) با سیکل استروس طبیعی، اوارکتومی گردید و سپس تخمدان سمت راست آن‌ها منجمد شد و پس از ذوب به دو گروه تقسیم گردیدند: انجمادی-پیوندی (n=11) (VT) و انجمادی کپسوله‌شده در هیدروژل اسید هیالورونیک-پیوندی (n=11) (VT+HA) که در داخل عضلهٔ پشتی همان رت پیوند زده شد؛ سپس از روز ۴ پس از پیوند، روزانه از رت‌ها اسمیر واژن تهیه گردید و در پایان اولین سیکل استروس (تقریباً ۱۵ روز پس از پیوند)، تخمدان‌ها از بدن رت‌ها خارج شد و با روش Real time PCR، بعضی از ژن‌های دخیل در آپوپتوز ازجمله P53، c-Myc، Bax، Bcl-2، Caspase3 ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که همهٔ پیوندها کاملاً موفقیت‌آمیز بود (۱۰۰ درصد پیوند موفق)؛ همچنین میزان بیان ژن‌های P53، c-Myc، Bax، Caspase 3 در گروه VT بالاتر از گروه VT+HA بود. بااین‌حال، تنها در مورد ژن c-Myc این اختلاف معنادار مشاهده شد ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: هیدروژل هیالورونیک اسید توانسته است پس از پیوند، میزان آپوپتوز را در گروه دارای کپسول (VT+HA) نسبت به گروه بدون کپسول (VT) کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: بافت تخمدان، انجماد شیشه‌ای، پیوند تخمدان، هیدروژل هیالورونیک اسید، آپوپتوز

استناد: اخوان طاهری، مریم؛ رضازاده ولوجردی، مجتبی؛ ابراهیمی، بیتا. میزان بیان ژن‌های آپوپتوز پس از پیوند اتوگرافت بافت تخمدان انجمادی کپسوله‌شده با هیدروژل اسید هیالورونیک در رت. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۰؛۲۹(۵): ۲۱-۱۲.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]
CC BY NC
حق‌مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

امروزه، تشخیص سرطان و درمان‌های آن شامل جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی عمر مبتلایان را افزایش داده است؛ اما متأسفانه این درمان‌ها سبب آسیب به عروق خونی و فیبروز کانونی قشر تخمدان، از دست رفتن منابع فولیکولی، نارسایی زودرس تخمدان و درنهایت کاهش باروری می‌شود (۳-۱). برای حفظ باروری در این بیماران چندین انتخاب وجود دارد که عبارت‌اند از: انجماد جنین، انجماد تخمک و انجماد بافت تخمدان. البته انتخاب هریک از این روش‌ها به نوع سرطان، روش درمانی، زمان رادیوتراپی، سن و وضعیت بیمار بستگی دارد (۴). انجماد جنین و انجماد تخمک برای همهٔ بیماران ازجمله دختران نابالغ و زنان مجرد قابل‌استفاده نیست؛ بنابراین، انجماد بافت تخمدان به‌عنوان یک تکنیک ارزشمند برای حفظ باروری در زنان و کودکانی است که تحت درمان‌های سیتوتوکسیک (شیمی‌درمانی و رادیوتراپی) قرارگرفته‌اند؛ همچنین این تکنیک برای حفاظت از گونه‌های حیوانی در حال انقراض قابل‌استفاده است (۵). از دیگر مزایای انجماد بافت تخمدان اینکه تعداد فراوانی فولیکول بدوی و اولیه ذخیره می‌شود، نیاز به تأخیر در روند درمان سرطان نیست و علاوه بر آن، این روش را می‌توان در هر مرحله از سیکل تولیدمثلی انجام داد (۶،۷).

پس از انجماد و ذوب بافت تخمدان، سه راهکار برای رشد فولیکول‌های موجود در بافت وجود دارد که عبارت‌اند از: ۱. کشت آزمایشگاهی قطعات بافتی؛ ۲. کشت آزمایشگاهی فولیکول‌های جداشده از بافت و ۳. پیوند بافت منجمد و ذوب‌شده به خود فرد (اتوگرافت) یا به گونهٔ دیگر (زنوگرافت). کشت تخمدان انسانی و فولیکول‌های کوچک جداشده از بافت انجمادی در مرحلهٔ تحقیقاتی هستند و هنوز بالینی نشده‌اند (۸). از سال ۱۸۶۳ تاکنون، مطالعات متعددی روی پیوند بافت تخمدان در حیوانات و حتی انسان صورت گرفته که تا امروز، به تولد بیش از ۲۰۰ نوزاد انسان منجر شده است (۹،۱۰).

از سوی دیگر، موفقیت پیوند تخمدان به عوامل متعددی ازجمله محل پیوند، بستر عروقی، دورهٔ ایسکمی، تکنیک به‌کارگرفته‌شده در جراحی و عوامل محیطی دخیل در تسریع رگ‌زایی بستگی دارد (۱۱). علی‌رغم قابل‌برگشت بودن فعالیت تخمدان پس از پیوند، ذخایر فولیکولی به علت صدمات ایسکمیک به‌شدت کاهش می‌یابد (۱۲). ایسکمی ایجادشده پس از پیوند بافت، با به راه انداختن مسیر آپوپتوز، به آسیب بافتی و مرگ فولیکول‌ها و کاهش ذخیرهٔ فولیکولی به میزان ۹۵-۶۰ درصد منجر می‌شود که این میزان شامل آسیب به همهٔ جمعیت فولیکول‌های در حال رشد است (۱۳). ازآنجاکه کاهش آپوپتوز بر شروع دوبارهٔ فعالیت تخمدانی مؤثر است، برای این منظور تدابیر مختلفی به‌کار گرفته‌شده است، از آن جمله می‌توان به استفاده از داربست‌ها (۱۴،۱۵)، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در حین یا پس از پیوند اشاره کرد (۱۶)؛ بنابراین، در این مطالعه از داربست اسید هیالورونیک به‌منظور کاهش آپوپتوز پس از پیوند استفاده شد.

اسید هیالورونیک یا هیالورونان یک نوع گلیکوزآمینوگلیکان است که از واحدهای تکرارشوندهٔ د-گلوکورونیک اسید و ان-استیل گلوکز آمین تشکیل‌شده است و در بافت همبند مهره‌داران یافت می‌گردد (۱۷). این ماده در تکامل جنین، شکل‌گیری بافت‌ها و ترمیم زخم و آنژیوژنز نقش دارد (۱۸)؛ بنابراین، در این مطالعه از هیدروژل اسید هیالورونیک به‌منظور کاهش آپوپتوز پس از پیوند بافت تخمدان انجمادی استفاده شد؛ همچنین برای بررسی بهتر و ساده‌تر ژن‌های دخیل در آپوپتوز، برخی مطالعات این فرایند را به چهار مرحله تقسیم می‌کنند: اولین مرحله، دریافت یک محرک کشندهٔ نیرومند توسط سلول است که این محرک می‌تواند پاتولوژیک یا فیزیولوژیک باشد؛ دومین مرحلهٔ آپوپتوز، روند مولکولی داخل سلولی است که پس از دریافت تحریکات خارج سلولی، در داخل سلول به راه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

می‌افتد؛ در مرحلهٔ سوم، این سیگنال‌های مولکولی ایجادشده به‌منظور یکپارچه‌سازی به مراکز تنظیم‌کننده می‌رسند تا تصمیم نهایی مرگ یا زندگی گرفته شود. اگر سلول از این مرحله عبور کند، مرحلهٔ چهارم شامل مولکول‌های مؤثر موردنیاز برای از بین بردن سلول است (۱۹). در مطالعهٔ حاضر، از هر مرحلهٔ آپوپتوز چند ژن انتخاب و میزان بیان هریک بررسی شد.

مواد و روش ها

اوارکتومی و انجماد-ذوب بافت تخمدان: در این پژوهش، از ۲۲ سر موش صحرایی (رت) مادهٔ بالغ (۸ هفته‌ای) ۱۰۰ تا ۱۵۰ گرمی نژاد ویستار، تهیه‌شده از موسسهٔ تحقیقاتی پاستور (موسسهٔ پاستور، ایران، تهران) استفاده گردید. حیوانات همگی در شرایط یکسان و در یک اتاق کنترل‌شده از نظر حرارت و رطوبت و در سیکل ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شرایط نگهداری و مراحل جراحی به تأیید کمیتهٔ اخلاق دانشگاه تربیت مدرس (کد اخلاق: ۵۲۱۱۲۴۲۹) رسید. یک هفته پیش از شروع جراحی‌ها، برای اطمینان از داشتن سیکل تولیدمثلی مرتب، روزانه از همهٔ موش‌های صحرایی اسمیر واژن تهیه شد. موش‌های صحرایی دارای دست‌کم ۲ سیکل استروس مرتب متوالی، درحالی‌که در مرحلهٔ دی‌استروس سیکل تولیدمثلی خود بودند، برای انجام جراحی انتخاب و به دو گروه کنترل (پیوند بافت تخمدان انجمادی بدون هیدروژل اسید هیالورونیک؛ VT) و گروه آزمایشی (پیوند بافت تخمدان انجمادی کپسوله‌شده در هیدروژل اسید هیالورونیک به‌تنهایی؛ VT+HA) تقسیم گردیدند. موش‌های صحرایی به‌وسیلهٔ داروهای کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بیهوش شدند؛ سپس تخمدان‌های دو طرف از بدن رت‌ها خارج گردید (اوارکتومی) و تخمدان‌های سمت راست سریعاً منجمد شدند. فرمول محلول انجمادی که برای هر دو گروه استفاده گردید، بر اساس روش Kagawa بود (۲۰, ۲۱) که جزئیات آن به این شرح است:

۱. در مرحلهٔ اول، تخمدان‌ها در محلول تعادلی حاوی HEPES tissue culture medium (HTCM)، ترکیب دو ضدیخ اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه‌شده از شرکت سیگما (D2650, sigma) (هرکدام به میزان ۷/۵ درصد) و ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی (HSA) قرار داده و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای محیط، روی لرزانندهٔ الکتریکی (شیکر) گذاشته شدند.

۲. در مرحلهٔ دوم، تخمدان‌ها وارد محلول انجمادی دوم حاوی HTCM، ترکیب دو ضدیخ اتیلن گلیکول و DMSO (هرکدام به میزان ۲۰ درصد) و ۰/۵ مول سوکروز گردید و به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده و بلافاصله در نیتروژن مایع (C°196-) به مدت ۳۰ دقیقه فروبرده شدند؛ سپس تخمدان‌ها از داخل نیتروژن خارج و بلافاصله وارد مرحلهٔ ذوب گردیدند. ذوب در سه مرحله صورت گرفت: ۱. ابتدا تخمدان در محلول HTCM و ۱ مول سوکروز به مدت ۱ دقیقه و در دمای C°37 قرار گرفت؛ ۲. سپس تخمدان در محلولHTCM و ۰/۵ مول سوکروز به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق نگهداری شد؛ ۳.¬در مرحلهٔ سوم، تخمدان در محلول HTCM به‌تنهایی، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق قرار گرفت.

انکپسوله کردن بافت تخمدان با هیدروژل هیالورونیک اسید: در گروه کنترل که نیازی به کپسوله کردن بافت تخمدان نبود، تخمدان انجمادی_ذوب‌شدهٔ هر رت به داخل عضلهٔ پشتی بزرگ همان رت پیوند زده شد. در گروه آزمایشی از کیت هیدروژل اسید هیالورونیک (America,Advance BioMatrix) استفاده گردید. این کیت از سه جزء اصلی Heprasil®، Gelin-S™ و Extralink® تشکیل‌شده است. برای کار با این کیت، بر طبق پروتکل، هریک اجزای آن در آب دیونیزهٔ موجود در کیت حل گردید؛ سپس داخل یک پتری دیش استریل ۴۰ میکرولیتر از Heprasil و ۴۰ میکرولیتر از Gelin-S ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه شیکینگ، ۲۰ میکرولیتر از Extralinkبا آن‌ها مخلوط و پس از چند بار پیپتاژ تخمدان در داخل آن قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی صفحهٔ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

گرم (Tokai-Hit thermoplate, Japan) قرار گرفت. دمای ۳۷ درجهٔ صفحهٔ گرم باعث ژله‌ای شدن این سه ترکیب پس از ۲۰ دقیقه می‌شود، به‌طوری‌که یک لایه ژل روی تخمدان تشکیل گردید؛ سپس بافت به داخل عضلهٔ پشتی همان رت پیوند و درنهایت، عضلات به کمک نخ قابل‌جذب P.G.A، ۵/۰ و پوست با نخ غیرقابل‌جذب نایلون ۴/۰ بخیه زده شد.

بررسی میزان بیان ژن‌های آپوپتوز: برای این منظور، در پایان اولین سیکل استروس پس از پیوند، تخمدان‌ها از بدن موش‌های صحرایی خارج شد و میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی ازجمله P53, c-Myc (مربوط به مرحلهٔ دوم آپوپتوز)، Bcl-2, Bax (مربوط به مرحلهٔ سوم آپوپتوز) و Caspase3 (مربوط به مرحلهٔ چهارم آپوپتوز) به روش کمی Real Time PCR با یکدیگر مقایسه گردید. مراحل بررسی مولکولی به‌این‌ترتیب صورت گرفت: الف. استخراج RNA به روش دستی و با استفاده از ترایزول (Sigma, St. Louis, MO)؛ ب. بررسی کمیت RNA با استفاده از جذب نوری به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermo Scientific, Wilmington, DE)؛ ج. بررسی کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز؛ د. حذف آلودگی DNA ژنومی با کیت DNase I تهیه‌شده از شرکت Fermentas؛ ه. ساخت رشتهٔ مکمل mRNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Fermentas و تکثیر آن با استفاده از Applied) Real Time PCR Biosystems).

پرایمرها توسط نرم‌افزار کامپیوتری Allel ID و perlprimer طراحی شد و سپس توسط نرم‌افزار Gene Runner و Blast، پرایمرها برای اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن ارزیابی گردیدند. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران- ایران) ساخته شد و از ژن Actin beta (ACT-β) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول شمارهٔ ۱).

آنالیز آماری داده‌ها: نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های مختلف به‌صورت میانگین±خطای استاندارد (Mean±SEM) بیان گردید. برای تحلیل نتایج به‌دست‌آمده از Real time-PCR، ابتدا با فرمول ۲-ΔΔCT داده‌های خام به داده‌های قابل تفسیر تبدیل شد. به‌منظور مقایسهٔ میانگین بیان ژن‌ها، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.22 و آزمون Mann–Whitney تجزیه‌وتحلیل گردید. سطح معنی‌داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول شمارهٔ ۱. ویژگی پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده

ردیف	Target gene	Primer pair sequences	Accession number	Fragment size(bp)	Annealing temperature (^{0}C)
۱	ACT-β	F:CGTTGACATCCGTAAAGACC R:ATAGAGCCACCAATCCACAC	NM_031144.3	177	56.56 57.28
۲	c-Myc	F: CTATTTGGGGACAGTGTTCTC R: GGTCATAGTTCCTGTTAGCG	NM_012603.2	155	55.67
۳	P53	F: CCCTGAAGACTGGATAACTG R: GGGCAGAATATCATCTGGAG	NM_030989.3	121	54.86 55.07
۴	Bax	F: TTTGCTACAGGGTTTCATCCAG R: GTCCAGTTCATCGCCAATTC	NM_017059.2	139	58.58 57.17
۵	Bcl-2	F: GAGAGCGTCAACAGGGAGAT R: ACAGCCAGGAGAAATCAAACA	NM_016993.1	169	59.18 57.77
۶	Caspase3	F: ATGGACAACAACGAAACCTC R: GTACCATTGCGAGCTGAC	NM_012922.2	200	56.27 55.91

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

یافته ها

بررسی موفقیت پیوند و سیکل استروس: ۱۱ سر رت از گروه VT و ۱۱ سر رت از گروه VT+HA تحت جراحی قرار گرفتند. در هر دو گروه، درصد موفقیت پیوند بر اساس برقراری دوبارهٔ سیکل استروس پس از پیوند تخمدان انجمادی بررسی گردید، به این صورت که در هر گروه، رت‌هایی که پس از پیوند، سیکل استروس‌شان دوباره برقرار شد، به‌عنوان پیوند موفق تلقی گردید و در پایان اولین سیکل استروس، تخمدان‌های آن‌ها برای مطالعات بعدی جمع‌آوری شد. در هر دو گروه همهٔ پیوندها کاملاً موفقیت‌آمیز بود (۱۰۰ درصد پیوند موفق). نتایج مربوط به شمارش فولیکولی این مطالعه در مجلهٔ Biopreservation and Biobankingبه چاپ رسید.(21)

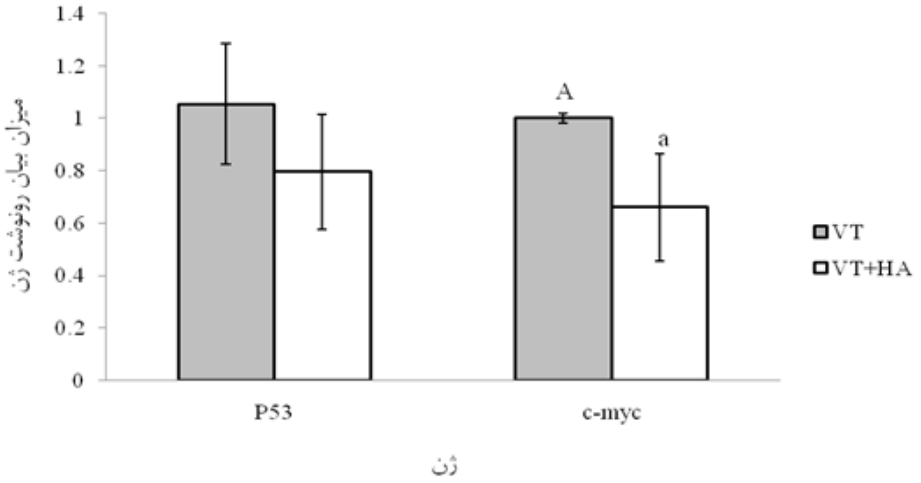
ژن‌های P53, c-Myc مربوط به مرحلهٔ دوم آپوپتوز(، Bcl-2, Bax(مربوط به مرحلهٔ سوم آپوپتوز) و Caspase3 (مربوط به مرحلهٔ چهارم آپوپتوز) پس از پایان سیکل اول استروس، از طریق تکنیکreal time PCR ، بر اساس میزان بیان ژن کنترل Actin beta (ACT-β) بررسی و در دو گروه VT و VT+HA با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج مربوط به میزان بیان رونوشت این ژن‌های به شرح ذیل است:

بیان ژن‌های P53 و c-Myc (مربوط به مرحلهٔ دوم آپوپتوز): از نظر میزان بیان رونوشت ژن p53 اختلاف معناداری میان دو گروه مشاهده نشد؛ اما میزان بیان رونوشت ژن c-myc در گروه VT+HA به‌طور معناداری کمتر از گروه VT بود (P<0.05) (شکل شمارهٔ ۱).

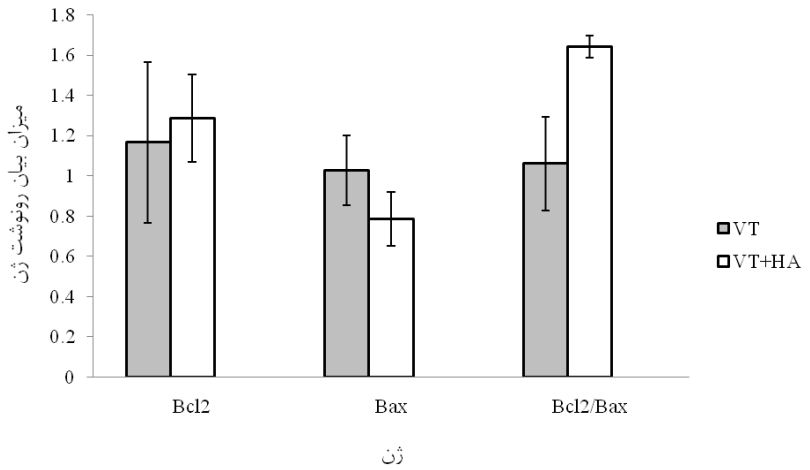
بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax (مربوط به مرحلهٔ سوم آپوپتوز): میزان بیان رونوشت ژن Bcl2 از لحاظ آماری، میان دو گروه معنادار نبود. سطح بیان ژن Bcl2 در گروه VT 12/0±01/1، در گروه VT+HA 01/0±24/1 ارزیابی شد؛ همچنین میزان بیان رونوشت ژن Bax در گروه VT (17/0±02/1)مشاهده گردید که نسبت به گروه VT+HA (13/0±78/0)این اختلاف معنادار نبود.

نسبت بیان رونوشت ژن‌های Bcl2 و Bax (Bcl2/Bax) نیز میان گروه‌ها با یکدیگر مقایسه شد. به‌این‌ترتیب، سطح بیان نسبی Bcl2/Bax در گروه VT 05/0±00/1 و در گروه VT+HA 30/0±64/1 بود، هرچند این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود (شکل شمارهٔ ۲).

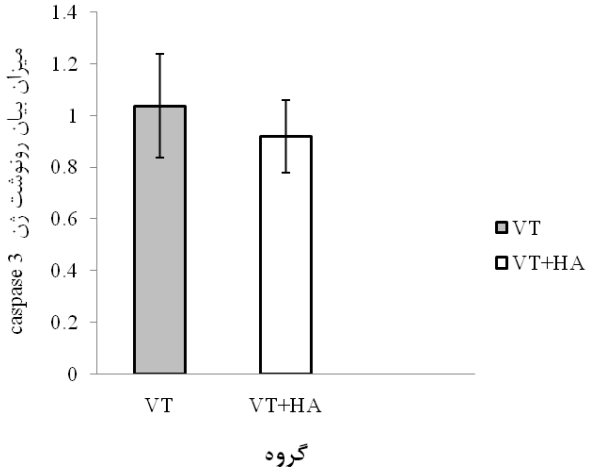
بیان ژن Caspase3: میزان بیان ژن Caspase3 در گروه VT (۱/۰±۰۰/۰۵) بیشتر از گروه VT+HA (۰/۰±۸۰/۰۴) بود؛ اما اختلاف آماری معناداری میان دو گروه دیده نشد (شکل شمارهٔ ۳)



شکل شمارهٔ ۱. میزان بیان ژن‌های P53 و c-Myc (مربوط به مرحلهٔ دوم آپوپتوز) یک سیکل استروس پس از پیوند در دو گروه پیوندی. داده‌ها به‌صورت میانگین میزان بیان رونوشت ژن‌های آپوپتوتیک نسبت به ژن ACT-β ± میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه‌شده‌اند. VT. پیوند بافت تخمدان انجمادی؛ VT+HA. پیوند بافت تخمدان انجمادی کپسوله‌شده در هیدروژل اسید هیالورونیک. ستون‌های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a) با یکدیگر اختلاف معنادار دارند (P<0.05).



شکل شمارهٔ ۲. میزان بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax (مربوط به مرحلهٔ سوم آپوپتوز) و Bcl2/Bax، یک سیکل استروس پس از پیوند در دو گروه پیوندی. داده‌ها به‌صورت میانگین میزان بیان رونوشت ژن‌های آپوپتوتیک نسبت به ژن ACT-β±میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده‌اند. VT. پیوند بافت تخمدان انجمادی؛ VT+HA. پیوند بافت تخمدان انجمادی کپسوله‌شده در هیدروژل اسید هیالورونیک. هیچ اختلاف معناداری میان دو گروه مشاهده نشد.



شکل شمارهٔ ۳. میزان بیان ژن Caspase3 (مربوط به مرحلهٔ چهارم آپوپتوز)، یک سیکل استروس پس از پیوند در دو گروه پیوندی. داده‌ها به‌صورت میانگین میزان بیان رونوشت ژن Caspase3 نسبت به ژن ACT-β ± میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده‌اند. VT. پیوند بافت تخمدان انجمادی؛ VT+HA. پیوند بافت تخمدان انجمادی کپسوله‌شده در هیدروژل اسید هیالورونیک. هیچ اختلاف معناداری میان گروه‌ها مشاهده نشد

بحث و نتیجه‌گیری

موفقیت پیوند بافت تخمدان هتروتوپیک (بدون آناستوموز عروقی) به رشد عروق خونی جدید وابسته است. رشد سریع‌تر عروق سبب کاهش صدمات ایسکمیک و درنتیجه، بازگشت سریع‌تر فعالیت تخمدانی می‌شود. با توجه به مطالعات انجام‌شده، بهبود کیفیت و کاهش آپوپتوز بافت تخمدان پیوندی می‌تواند از طرق مختلف ازجمله استفاده از عوامل مؤثر در رگ‌زایی همچون فاکتورهای رشد (۲۲)، فیبرین (۱۲) و چسب اسید هیالورونیک (۲۳) به‌دست آید. در مطالعهٔ حاضر، از هیدروژل اسید هیالورونیک با خاصیت رگ‌زایی، با هدف سرعت بخشیدن به فرایند آنژیوژنز، کاهش آپوپتوز و حفظ ذخایر فولیکولی پس از پیوند بافت تخمدان انجمادی رت استفاده شد. بااین‌حال، کاربرد هیدروژل اسید هیالورونیک به‌تنهایی در میزان موفقیت پیوند تغییری ایجاد نکرد و در هر دو گروه درصد موفقیت پیوند یکسان بود.

P53 یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های چرخهٔ تکثیر سلولی است که آن را محافظ ژنوم نیز می‌نامند. این مولکول با ایجاد وقفه در مرحلهٔG2 ، سبب مهار چرخهٔ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

سلولی می‌شود و با القای آپوپتوز از ایجاد تومور جلوگیری می‌کند. تخریب DNA عامل اصلی فعالیت این مولکول است (۲۴).

c-Myc یکی دیگر از پروتئین‌هایی است که در تنظیم رشد سلولی و آپوپتوزیس نقش دارد. تقریباً علت یک‌سوم سرطان‌های انسانی ناشی از بیان تنظیم‌نشدهٔ پروتئین c-Myc است و بیان بیش‌ازحد این ژن در مراحل پیشرفتهٔ برخی از سرطان‌ها مشاهده می‌شود که با پیش‌آگهی ضعیف بیماری ارتباط مستقیم دارد (۲۵). در اوایل دههٔ ۱۹۹۰، ایوان و همکارانش عنوان کردند که c-Myc در فرایند آپوپتوز نیز نقش فعالی دارد، به‌طوری‌که در سلول‌های نرمال بیان پایینی از c-Myc هست. در مقابل، سلول‌هایی که بیان c-Myc در آن‌ها افزایش می‌یابد، محکوم به مرگ‌اند و تحت فرایند آپوپتوز قرار می‌گیرند (۲۶). در مطالعهٔ حاضر، میزان بیان ژن‌های P53 و c-Myc که هر دو در مرحلهٔ دوم آپوپتوز بیان می‌شوند، در گروه VT بالاتر از گروه VT+HA بود؛ اما تنها از نظر بیان ژن c-Myc، میان دو گروه اختلاف معنادار بود. به‌هرحال، این موضوع نشان می‌دهد هیالورونیک اسید توانسته است بیان ژن‌های مرحلهٔ دوم آپوپتوز را کاهش دهد.

Bcl2 یک پروتئین غشایی است که اساساً در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد. در پستانداران نوزده عضو از خانوادهٔ Bcl2 شناسایی‌شده است که با توجه به فعالیت و ساختار، به سه دسته تقسیم‌شده‌اند: دستهٔ اول. اعضای ضدآپوپتوز که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از Bcl2 : و-Bcl XL؛ دستهٔ دوم. اعضای پروآپوپتوز که می‌توان از این گروه به Bax و Bak اشاره کرد؛ دستهٔ سوم. مهم‌ترین اعضای گروه سوم عبارت‌اند از Bad :، Bin و. (27) Bik بررسی‌های مولکولی انجام‌شدهٔ یک سیکل پس از پیوند در دو گروه نشان داد که میزان بیان ژن Bcl2 و Bax اختلاف آماری معناداری میان گروه‌ها نداشت. بااین‌حال، در این مرحله نیز گروه دارای هیالورونیک اسید سطح پایین‌تری از بیان ژن‌های آپوپتوزی را داشته است.

کاسپازها اجرایی‌ترین ژن‌های روند آپوپتوز هستند. این خانواده در پستانداران چهارده عضو دارد که یازده عضو آن آنزیم‌های انسانی هستند. این آنزیم‌ها مسیر مرگ را هماهنگ می‌کنند و نقش مهمی در پیشبرد مرگ سلولی دارند (۲۸). کاسپازها مربوط به مرحلهٔ چهارم آپوپتوز هستند. کاسپازها را معمولاً به دو گروه کاسپازهای آغازگر شامل کاسپازهای ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ با پرودمین طویل و کاسپازهای اجراکننده شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ با پرودمین کوتاه تقسیم می‌کنند. درواقع، کار اصلی کاسپازهای آغازگر فعال کردن کاسپازهای اجراکننده است (۲۹). در این مطالعه، میزان رونوشت کاسپاز ۳ میان دو گروه مقایسه گردید و علی‌رغم بالاتر بودن سطح بیان این ژن در گروهVT ، تفاوت معناداری میان دو گروه مشاهده نشد.

این نتایج نشان می‌دهد علی‌رغم معنادار نبودن بسیاری از تفاوت‌ها، در همهٔ ژن‌ها الگوی بیان یکسانی مشاهده شد و هیدروژل اسید هیالورونیک توانست فرایند آپوپتوز را پس از پیوند، نسبت به گروه بدون کپسول کاهش دهد. با توجه به خاصیت رگ‌زایی هیالورونیک اسید (۳۰)، این نتیجه دور از انتظار نیست؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود بیان این ژن‌ها در زمان طولانی‌تری پس از پیوند نیز ارزیابی گردد؛ زیرا در طولانی‌مدت با مرگ‌ومیر سلول‌های بیشتر ممکن است تفاوت بیان ژن‌ها بیشتر مشهود شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه رویان (کد طرح P-90-284) و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق: 52112429

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

References

1. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. Hum Rep Up2009;15:649-65. doi.10.1093/humupd/dmp021.
2. Marin L, Bedoschi G, Kawahara T, Oktay KH. History evolution and current state of ovarian tissue autotransplantation with cryopreserved tissue a successful translational research Journey from 1999 to 2020. Rep Sci 2020:1-8. doi.10.1007/s43032-019-00066-9.
3. Kim S, Lee Y, Lee S, Kim T. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. Obste Gynecol Sci 2018;61:431. doi. 10.5468/ogs.2018.61.4.431.
4. Donnez J, Dolmans M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Restoration of ovarian function after orthotopic intraovarian and periovarian transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia case report. Hum Rep 2006;21:183-8. doi.10.1093/ humrep/dei268
5. Santos R, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. Anim Rep Sci2010;122:151-63. doi.10.1016/j.anireprosci.2010.08.010
6. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation preliminary findings and implications for cancer patients. Hum Rep Up 2001;7:526-34 . doi.10.1093/humupd/7.6.526
7. Fathi R, Rezazadehvalojerdi M, Salehnia M, Ebrahimi B, Salmanyazdi R. Ovarian tissue transplantation advantages disadvantages and upcoming challenges. J Mazandaran Uni Med Sci 2014;24:253-65
8. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonckt A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. Rep Biomed 2011;23:160-86
9. Hossay C, Donnez J, Dolmans MM. Whole ovary cryopreservation and transplantation: a systematic review of challenges and research developments in animal experiments and humans. J Clin Med 2020;9:3196. doi.10.3390/jcm9103196
10. Roness H, Meirow D. Fertility preservation follicle reserve loss in ovarian tissue transplantation. Reproduction 2019;158:35-44. doi.10.1530/REP-19-0097.
11. Damous LL, Silva SMd, Lopes RAM, Sakano CRdSB, Simoes MdJ, Montero EFDS. Study on the vaginal smear of rats submitted to autologous ovarian transplant impact of remote ischemic preconditioning. Acta Cir Brasile2009;24:387-92. doi.10.1590/S0102-86502009000500009
12. Gao JM, Yan J, Li R, Li M, Yan LY, Wang TR, et al. Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibro
13. Liu L, Wood G, Morikawa L, Ayearst R, Fleming C, McKerlie C. Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult Mouse ovaries. Hum Rep 2008;23:122-8. doi.10.1093/ humrep/dem348
14. Shiraztehrani A, Mazoochi T, Akhavantaheri M, Salehnia M. The effects of ovarian encapsulation with alginate hydrogel on morphology and follicular count of vitrified Mouse ovary. J Feyz2019;23:467-75
15. Tehrani AS, Mazoochi T, Taheri MA, Aghadavood E, Salehnia M. The effects of ovarian encapsulation on morphology and expression of apoptosis related genes in vitrified Mouse ovary. J Rep Inf2021;22:23 . doi.10.18502/jri.v22i1.4992
16. Gao J, Huang Y, Li M, Zhao H, Zhao Y, Li R, et al. Effect of local basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on subcutaneously allotransplanted ovarian tissue in ovariectomized Mice. PLos One 2015;10: 134035. doi.10.1371/journal.pone.0134035
17. Fraser J, Laurent T, Laurent U. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J Int Med 1997;242:27-33. doi.10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x
18. Sattar A, Rooney P, Kumar S, Pye D, West DC, Scott I, et al. Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin. J Invest Dermatol1994;103:576-9. doi.10.1111/1523-1747. ep12396880.
19. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. Dev Biol 1999;213:1-17. doi.10.1006/dbio.1999.9344.
20. Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. Rep Biomed 2009;18:568-77. doi.10.1016/s1472-6483(10)60136-8.
21. Akhavan Taheri M, Rezazadeh Valojerdi M, Ebrahimi B. Intramuscular autotransplantation of vitrified rat ovary encapsulated with hyaluronic acid hydrogel. Biopres Biobank2016;14:114-21. doi.10.1089/bio.2015.0021
22. Wang L, Ying YF, Ouyang YL, Wang JF, Xu J. VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental Rabbit model. J Assist Rep Genet 2013;30:1301-11. doi.10.1007/s10815-013-0043-9
23. Tavana S, Azarnia M, Valojerdi MR, Shahverdi A. Hyaluronic acid based hydrogel scaffold without angiogenic growth factors enhances ovarian tissue function after autotransplantation in Rats. Biomedical Mate2016;11: 55006. doi.10.1088/ 1748-6041/11/5/055006
24. Höpker K, Hagmann H, Khurshid S, Chen S, Schermer B, Benzing T, et al. Putting the brakes on p53 driven apoptosis. Cell Cycle2012;11:4122-8. doi.10.4161/cc.21997
25. Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c Myc. Oncogene1999;18:2967-87. doi.10.1038/ sj.onc.1202727
26. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c myc protein. Cell1992;69:119-28. doi.10.1016/0092-8674(92)90123-T
27. Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. Pharmacol Ther2004;101:1-15. d doi.10.1016/j.pharmthera.2003.08.005
28. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]

functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. Biochem Pharmacol. 2003;66(8): 1453-8. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00497-0

29. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. J Immunol Meth2002;265:97-110. doi.10.1016/S0022-1759 (02)00073-X

30. Tavana S, Valojerdi MR, Azarnia M, Shahverdi A. Restoration of ovarian tissue function and estrous cycle in rat after autotransplantation using hyaluronic acid hydrogel scaffold containing VEGF and bFGF. Growth Fact 2016;34:97-106. doi.10.1080/08977194.2016.1194835

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.4.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.12]