

The effect of vitrified ovarian tissue autotransplantation encapsulated with hyaluronic acid hydrogen on VEGF, CD31 and CD34 gene expression in rat

Akhavan-Taheri M¹, Rezazadeh-Valojerdi M^{2,3*}, Ebrahimi B³

1- Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

2- Department of Anatomy, Medical Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.

3- Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Institute, Royan Institute (ACECR), Tehran, I.R. Iran.

Received: 2020/10/9 | Accepted: 2021/02/17

Abstract:

Background: One of the problems after cryopreservation and ovarian tissue transplantation is ischemia followed by follicles mortality. In the present study, hyaluronic acid hydrogel was used to improve angiogenesis in vitrified ovarian tissue transplantation in rat.

Materials and Methods: In this experimental study, 22 adult female rats (~8 weeks old) with normal estrous cycles were ovariectomized, then their right ovaries were vitrified and warmed into two groups without hyaluronic acid hydrogel (VT) and encapsulated with hyaluronic acid hydrogel (VT+HA) was autotransplanted into the dorsal muscle. Daily vaginal monitoring was performed until re-initiation of first full oestrus cycles. The ovaries were removed at the end of the first estrus cycle and angiogenesis genes VEGF, CD31 and CD34 evaluated by real time PCR. Data were analyzed by Mann-Whitney test and the significance level was considered $P < 0.05$.

Results: All transplants were completely successful (100% successful transplant). There was no statistically significant difference in CD34 and CD31 genes between two groups. But VEGF gene expression was significantly lower in VT+HA group (0.25 ± 0.06) than VT group (1.00 ± 0.05) ($P < 0.05$). Thus, the VT group appeared more successful than the VT+HA group in expressing angiogenic genes at the end of the first estrus cycle.

Conclusion: Hyaluronic acid hydrogel does not play any effective role in the growth and improvement of angiogenesis after transplantation in the short term. But due to the angiogenic property of hyaluronic acid, increasing the expression of angiogenic genes in the VT + HA group may need more time.

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

*Corresponding Author

Email: mr_valojerdi@modares.ac.ir

Tel: 0098 212 230 7960

Fax: 0098 212 230 6481

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2021; Vol. 25, No 1, Pages 724-731

Please cite this article as: Akhavan-Taheri M, Rezazadeh-Valojerdi M, Ebrahimi B. The effect of vitrified ovarian tissue autotransplantation encapsulated with hyaluronic acid hydrogen on VEGF, CD31 and CD34 gene expression in rat. *Feyz* 2021; 25(1): 724-31.

اثر پیوند اتوگرافت بافت تخمدان انجمادی کپسوله شده با هیدروژل اسید هیالورونیک بر بیان ژنهای VEGF، CD31 و CD34 در رت

مریم اخوان طاهری^۱، مجتبی رضازاده ولوجردی^{۲،۳*}، بی تا ابراهیمی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: یکی از مشکلاتی که پس از انجماد و پیوند بافت تخمدان وجود دارد، ایسکمی و به دنبال آن مرگومیر فولیکولهاست. در مطالعه حاضر، هیدروژل اسید هیالورونیک با هدف بهبود آنژیوژنز در پیوند بافت تخمدان انجمادی رت استفاده شد. **مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی، ۲۲ رت ماده بالغ (۸^۳ هفته) با چرخه استروس (فحلی) طبیعی، اوارکتومی شدند و سپس تخمدان سمت راست آنها منجمد گردید و پس از ذوب، تحت دو گروه: بدون کپسوله شدن در هیدروژل اسید هیالورونیک (VT) و کپسوله شده در هیدروژل اسید هیالورونیک (VT+HA) در داخل عضله پشتی همان رت پیوند زده شدند. سپس در پایان اولین چرخه استروس، تخمدانها از بدن رتها خارج شدند و با روش Real time PCR بیان ژنهای رگزایی VEGF، CD31 و CD34 مورد ارزیابی قرار گرفتند. دادهها با استفاده از آزمون Mann-Whitney بررسی گردیدند و سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. **نتایج:** در همه رتها چندین روز پس از پیوند، چرخه استروس برقرار شد. بنابراین همه پیوندها کاملاً موفقیت آمیز بود. همچنین در مورد دو ژن CD34 و CD31 بین گروهها از لحاظ آماری اختلاف معناداری وجود نداشت. اما ژن VEGF به طور معناداری در گروه VT+HA (0.25 ± 0.06) نسبت به گروه VT (0.10 ± 0.05) بیان پایین تری داشت ($P < 0.05$). بنابراین در پایان اولین چرخه استروس، گروه VT در بیان ژنهای رگزایی موفق تر از گروه VT+HA ظاهر شد. **نتیجه گیری:** هیدروژل هیالورونیک اسید، نقش مؤثری جهت رشد و بهبود رگزایی پس از پیوند در کوتاه مدت ایفا نمی کند. اما با توجه به خاصیت رگزایی هیالورونیک اسید ممکن است زمان بیشتری جهت افزایش بیان این ژنها در گروه VT+HA لازم باشد. **واژگان کلیدی:** بافت تخمدان، انجماد، پیوند تخمدان، هیدروژل هیالورونیک اسید، رگزایی

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۱، فرودین-اردیبهشت ۱۴۰۰، صفحات ۷۳۱-۷۲۴

مقدمه

رادیوتراپی نیز بسته به دوز مورد استفاده، منجر به از دست رفتن منابع فولیکولی می شود، به ویژه اگر رادیوتراپی در ناحیه لگنی و برای تومورهای شکمی و سرطانهای دستگاه تناسلی مورد استفاده قرار گیرد [۳]. چندین انتخاب جهت حفظ باروری در زنان وجود دارد که عبارتند از: انجماد جنین، انجماد تخمک و انجماد بافت تخمدان. البته انتخاب هر یک از این روشها بستگی به زمان رادیوتراپی، نوع سرطان و روش درمانی، سن و وضعیت فرد دارد [۳]. انجماد جنین و انجماد تخمک برای دختران نابالغ و زنان مجرد قابل استفاده نمی باشد، بنابراین انجماد بافت تخمدان به عنوان یک تکنیک ارزشمند برای حفظ باروری در زنان و کودکانی است که تحت درمانهای سیتوتوکسیک (شیمی درمانی و رادیوتراپی) قرار گرفته اند. همچنین این تکنیک جهت حفاظت از گونه های حیوانی در حال انقراض مفید و قابل استفاده است [۳]. انجماد بافت تخمدان این امکان را فراهم می کند که تعداد زیادی سلول زای Germ cell، فولیکول بدوی و اولیه ذخیره شود؛ به علاوه می توان این روش را در هر مرحله از چرخه تولیدمثلی انجام داد. در این روش نیاز به تأخیر در روند درمان سرطان نیست، همچنین روشی قابل استفاده برای حفظ باروری در کودکان می باشد [۴]. سه استراتژی جهت رشد فولیکولهای موجود در بافت تخمدان

در دهه های اخیر، تشخیص سرطان و درمانهای جدید آن (شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی) عمر مبتلایان را افزایش داده است؛ اما متأسفانه این درمانها سبب کاهش باروری و نارسایی زودرس تخمدان (POF) می گردد [۱،۲]. داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی با از بین بردن تعداد زیادی از انواع فولیکولها از جمله فولیکولهای بدوی، سبب کاهش ذخایر فولیکولی شده، در نهایت منجر به کاهش سائز تخمدانها می گردد. همچنین شیمی درمانی می تواند سبب آسیب به عروق خونی و فیبروز کانونی قشر تخمدان شود.

۱. مرکز تحقیقات تولید سلولهای جنسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. گروه جنین شناسی، پژوهشکده علوم تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه آناتومی

تلفن: ۰۲۱۲۲۳۰۷۹۶۰ | **دولوپس:** ۰۲۱۲۲۳۰۶۴۸۱

پست الکترونیک: mr_valojerdi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۸ | **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۱۱/۲۹

مطالعه از هیدروژل اسید هیالورونیک به منظور بهبود رگ‌زایی و فولیکولوزن بافت تخمدان انجمادی - پیوندی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

اوارکتومی و انجماد - ذوب بافت تخمدان

در این پژوهش، از موش‌های صحرایی ماده بالغ (۸ هفته‌ای) ۱۰۰ تا ۱۵۰ گرمی نژاد ویستار، تهیه‌شده از مؤسسه تحقیقاتی پاستور (مؤسسه پاستور، ایران، تهران) استفاده گردید. حیوانات همگی در شرایط یکسان و در یک اتاق کنترل‌شده از نظر حرارت و رطوبت و در چرخه ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شرایط نگهداری و مراحل جراحی به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس (شماره اتیک ۵۲۱۱۲۴۲۹) رسید. یک هفته قبل از شروع جراحی‌ها، جهت اطمینان از داشتن چرخه تولیدمثلی مرتب، از همه موش‌های صحرایی، روزانه اسمیر واژن تهیه شد. موش‌های صحرایی دارای حداقل ۲ چرخه استروس مرتب متوالی، در حالی که در مرحله دی‌استروس چرخه تولیدمثلی خود بودند، جهت انجام جراحی انتخاب شدند و به دو گروه کنترل: (پیوند بافت تخمدان انجمادی بدون هیدروژل اسید هیالورونیک (VT) و گروه آزمایشی: (پیوند بافت تخمدان انجمادی کیسوله‌شده در هیدروژل اسید هیالورونیک به‌تنهایی (VT+HA) تقسیم گردیدند. موش‌های صحرایی به‌وسیله داروهای کتامین - زایلازین، بیهوش شدند. سپس تخمدان‌های دو طرف از بدن رت‌ها خارج (اوارکتومی) و تخمدان‌های سمت راست به‌سرعت منجمد شدند. فرمول محلول انجمادی که برای هر دو گروه مورد استفاده قرار گرفت، بر طبق روش Kagawa بود [۱۷، ۱۸] که جزئیات آن به این شرح است: ۱- در مرحله اول، تخمدان‌ها در محلول تعادلی حاوی محیط کشت بافت دارای HEPES (HEPES tissue culture medium) (HTCM)، ترکیب ضد یخ‌های اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) (هر کدام به میزان ۷/۵ درصد) و ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی (HSA) قرار داده شدند و به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای محیط، بر روی لرزاننده الکتریکی (شیکر) باقی ماندند.

۲- در مرحله دوم، تخمدان‌ها وارد محلول انجمادی حاوی HTCM، ترکیب ضد یخ‌های اتیلن‌گلیکول و DMSO (هر کدام به میزان ۲۰ درصد) و ۰/۵ مول سوکروز شدند و به‌مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفتند و بلافاصله در نیتروژن مایع (۱۹۶°C-) به‌مدت ۳۰ دقیقه فرو برده شدند. سپس تخمدان‌ها از داخل نیتروژن خارج و بلافاصله وارد مرحله ذوب شدند. ذوب در سه مرحله انجام شد:

انجمادی وجود دارد که عبارتند از: کشت آزمایشگاهی قطعات بافتی و یا فولیکول‌های جداشده از بافت، پیوند بافت منجمد و ذوب‌شده به خود فرد (اتوگرافت) و پیوند بافت منجمد و ذوب‌شده به گونه دیگر (زنوگرافت). با این حال هنوز نتایج رضایت‌بخشی از کشت تخمدان انسانی و فولیکول‌های کوچک جداشده از بافت انجمادی به‌دست نیامده است [۵]. از سال ۱۸۶۳ تاکنون مطالعات متعددی بر روی پیوند بافت تخمدان در حیوانات و انسان صورت گرفته که منجر به تولد بیش از ۲۰۰ نوزاد تا به امروز شده است [۹-۶]. موفقیت پیوند به عوامل متعددی، از جمله محل پیوند، بستر عروقی، دوره ایسکمی، تکنسین و تکنیک به کار گرفته شده، فاکتورهای محیطی و غیره بستگی دارد. یکی از عوامل مهم جهت موفقیت پیوند، تسریع آنژیوزن است که برای حیات فولیکول‌ها ضروری است [۶]. با وجود این‌که فعالیت تخمدان پس از پیوند ارتوتوپیک یا هتروتوپیک قابل برگشت است، اما ذخایر فولیکولی به‌دلیل صدمات ایسکمیک به شدت کاهش می‌یابد [۷]. در پیوند تخمدان انجمادی انسان به موش، حداقل ۲۵ درصد فولیکول‌های بدوی از دست می‌رود [۸]. گزارش‌ها دیگر، حاکی از این است که صدمات ناشی از ایسکمی در طول پیوند اتوگرافت سبب کاهش ذخیره فولیکولی به میزان ۶۰-۹۵ درصد می‌شود که این میزان به تمام جمعیت فولیکول‌های در حال رشد، آسیب می‌رساند [۹]. در رت، شروع رگ‌زایی مجدد پس از پیوند بافت تخمدان به محل‌های اکتوپیک، ۴۸ ساعت پس از پیوند است و عروق عملکردی پس از ۷ روز از پیوند ایجاد می‌شوند [۱۰]. از آن‌جا که رگ‌زایی برای فعالیت تخمدان پیوندی مؤثر است، تدابیر مختلفی با هدف بهبود رگ‌زایی پس از پیوند به کار گرفته شده است که از آن جمله می‌توان به استفاده از داربست‌ها [۱۱، ۱۲]، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها جهت سرعت‌بخشیدن و شروع مجدد فعالیت تخمدانی اشاره نمود [۱۳]. VEGF به‌عنوان عامل نفوذپذیری عروقی شناخته می‌شود، خاصیت تحریک میتوز دارد و می‌تواند سلول‌های اندوتلیالی را وادار به مهاجرت نماید. در کنار VEGF عوامل دیگری نیز در فرآیند رگ‌زایی دخالت می‌کنند که از آن جمله می‌توان به دو عامل مهم دیگر، یعنی CD31 و CD34 اشاره نمود که همگی توسط سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شوند و می‌توانند معیار خوبی برای بررسی میزان رگ‌زایی باشند [۱۴]. اسید هیالورونیک یا هیالورونان یک نوع گلیکوزآمینوگلیکان است که در بافت همبند مهره‌داران وجود دارد [۱۵]. این ماده در تکامل جنین، شکل‌گیری بافت‌ها، ترمیم زخم و آنژیوزن نقش دارد [۱۶]. بنابراین در این

واژن تهیه شد تا به این ترتیب برقراری مجدد محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد، بررسی گردد. فاز استروس هر حیوان به طور روزانه ثبت شد و شروع چرخه استروس در هر رت مشخص گردید. سپس همه رت‌ها در پایان اولین چرخه استروس، در حالی که در مرحله استروس چرخه تولیدمثلی خود بودند، بیهوش و سپس کشته شدند و تخمدان‌ها از بدن آن‌ها خارج گردیدند.

بررسی میزان بیان ژن‌های رگ‌زایی

برای این منظور در پایان اولین چرخه استروس پس از پیوند، تخمدان‌ها از بدن موش‌های صحرایی خارج شدند و میزان بیان ژن‌های رگ‌زایی (VEGF, CD34, CD31) به روش کمی Real Time PCR با یکدیگر مقایسه گردیدند. مراحل بررسی مولکولی، عبارتند از: الف) استخراج RNA، ب) بررسی کمیّت RNA با استفاده از جذب نوری، ج) بررسی کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز، ه) ساخت رشته مکمل mRNA (سنتر cDNA) و تکثیر آن با استفاده از Real Time PCR. جداسازی RNA کل به روش دستی و با استفاده از تریزول و کلروفرم انجام شد. پس از استخراج RNA، کمیّت و کیفیت آن به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ و الکتروفورزر ژل آگاروز بررسی گردید. پرایمرها توسط نرم‌افزار کامپیوتری Allel ID و per primer طراحی شدند و سپس پرایمرها توسط نرم‌افزار Gene Runner و Blast جهت اطمینان از یکتا بودن محلّ جفت شدن، مورد ارزیابی قرار گرفتند. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران - ایران) ساخته شد. از ژن Actin, beta (Actb) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

۱- ابتدا تخمدان‌ها در محلول HTCM و ۱ مول سوکروز به مدت ۱ دقیقه و در دمای C ۳۷ قرار گرفتند.

۲- سپس تخمدان‌ها در محلول HTCM و ۰/۵ مول سوکروز به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق قرار گرفتند.

۳- در مرحله سوم تخمدان‌ها در محلول HTCM به‌تنهایی، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق قرار گرفتند.

انکپسوله کردن بافت تخمدان با هیدروژل هیالورونیک اسید

در گروه کنترل که نیازی به کیسوله کردن بافت تخمدان نبود، تخمدان انجمادی - ذوب شده هر رت در داخل عضله پستی بزرگ همان رت پیوند زده شد. در گروه آزمایشی از کیت هیدروژل اسید هیالورونیک (America, Advance BioMatrix) استفاده شد. این کیت از سه جزء اصلی Heparin-STM, Gelin-STM و Extralink[®] تشکیل شده است. جهت کار با این کیت، بر طبق پروتکل، هر یک از اجزای آن در آب دیونیزه موجود در کیت حل شد، سپس داخل یک پتری دیش استریل ۴۰ میکرولیتر از Heparin-S و ۴۰ میکرولیتر از Gelin-S ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه شیکینگ، ۲۰ میکرولیتر از Extralink با آن‌ها مخلوط گردید و پس از چندبار پیچان، تخمدان در داخل آن گذاشته شد و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی صفحه گرم قرار گرفت. پس از آن که یک لایه ژل روی تخمدان تشکیل شد، بافت در داخل عضله پیوند زده شد. عضلات به کمک نخ قابل جذب P.G.A، ۵/۰ با بخیه ساده سرتاسری بسته شدند. پوست نیز با نخ غیرقابل جذب نایلون ۴/۰ به وسیله بخیه تکی ساده بسته شد و با نرمال سالین تمیز گردید. از روز ۴ پس از پیوند، از رت‌ها روزانه بین ساعت ۹-۷ صبح اسمیر

جدول شماره ۱- ویژگی پرایمرهای اختصاصی طراحی شده

ردیف	Target gene	Primer pair sequences	Accession number	Fragment size(bp)	TM
۱	Actin, beta (Actb)	F:CGTTGACATCCGTTAAAGACC R:ATAGAGCCACCAATCCACAC	NM_001144.331144.3	177	56.56 57.28
۲	CD31	F: TACACTTATTTTGAACCAGCC R: TCTGCACACCCAACATTAACA	NM_031591.1	106	55.90 58.06
۳	CD34	F: CAGAACTTCCAGCAAACTCCA R: TCCCGAGGTAACCAATGCAAT	NM_001107202.2	143	59.05 59.72
۴	VEGF a	F: TGAAACCATGAACCTTCTGCTC R: AACTTCACCACTTCATGGGCT	NM_031836.2	132	57.16 59.85

Whitney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی موفقیت پیوند و چرخه استروس در گروه VT، ۱۱ سر رت و در گروه VT+HA، ۱۱ سر رت تحت جراحی قرار گرفتند. در هر دو گروه، درصد موفقیت

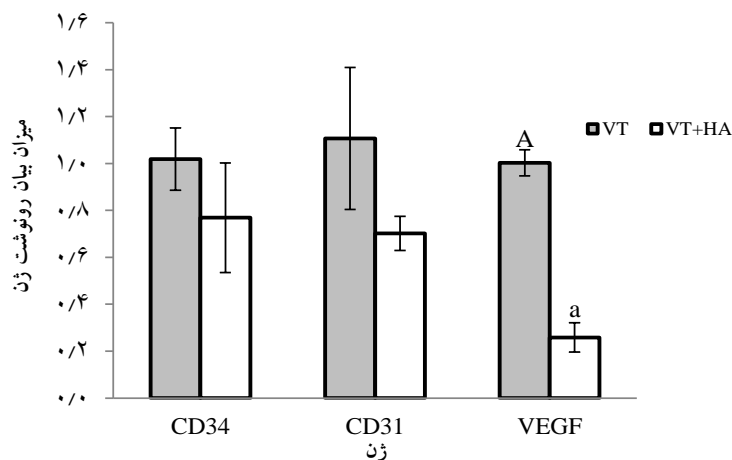
آنالیز آماری داده‌ها

نتایج حاصل از آزمایشات مختلف، به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان گردید. جهت تحلیل نتایج حاصل از Real-time-PCR، ابتدا با فرمول $\Delta\Delta CT$ داده‌های خام به داده‌های قابل تفسیر تبدیل شد. به منظور مقایسه‌ی میانگین بیان ژن‌ها داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ و آزمون Mann-

و در گروه VT+HA به $6/72 \pm 0/82$ افزایش داشت. اما اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از نظر طول چرخه استروس مشاهده نشد. نتایج مربوط به شمارش فولیکولی این مطالعه در مجله Biopreservation and Biobanking به چاپ رسید [۱۸] و نتایج مربوط به بیان ژن‌های رگ‌زایی به شرح ذیل می‌باشد: میزان بیان رونوشت ژن‌های رگ‌زایی یک چرخه استروس پس از پیوند تخمدان:

میزان بیان رونوشت ژن‌های رگ‌زایی VEGF, CD31, CD34 در پایان اولین چرخه استروس پس از پیوند، از طریق تکنیک real time PCR براساس میزان بیان ژن کنترل Actin (β -ACT) بررسی و در دو گروه با یکدیگر مقایسه شد. نتایج نشان داد که در مورد دو ژن CD31 و CD34 بین گروه‌ها از لحاظ آماری اختلاف معناداری وجود ندارد. ژن VEGF بیان پایینی در گروه VT+HA ($0/25 \pm 0/06$) داشت و از لحاظ آماری اختلاف معناداری با بیان این ژن در گروه VT ($1/00 \pm 0/05$) وجود داشت ($P < 0/05$) (نمودار شماره ۱).

پیوند، براساس برقراری مجدد چرخه استروس، پس از پیوند تخمدان انجمادی بررسی گردید. به این صورت که در هر گروه، رت‌هایی که پس از پیوند، چرخه استروس‌شان مجدداً برقرار شد، به‌عنوان پیوند موفق تلقی شد و در پایان اولین چرخه استروس، تخمدان‌های آن‌ها جهت مطالعات بعدی جمع‌آوری شد. در هر دو گروه، همه پیوندها کاملاً موفقیت‌آمیز بود (۱۰۰ درصد پیوند موفق). روز شروع فاز استروس در گروه VT بین روزهای ۱۳-۶ و در گروه VT+HA بین روزهای ۱۶-۶ پس از پیوند بود. همچنین زمان پایان اولین چرخه استروس در گروه VT و VT+HA به ترتیب روزهای ۲۸-۱۰ و ۲۹-۱۰ بود. از لحاظ آماری بین گروه‌ها از نظر میانگین زمان شروع فاز استروس و زمان پایان اولین چرخه استروس، اختلاف معناداری مشاهده نشد. در رت‌های و بیستار طول چرخه استروس به‌طور متوسط ۴ روز می‌باشد. بررسی چرخه رت‌ها قبل از جراحی نیز این نکته را تأیید کرد. پس از جراحی و با شروع چرخه استروس در رت‌ها، مشاهده شد که در برخی از آن‌ها طول چرخه قدری طولانی‌تر از رت‌های طبیعی است؛ به‌طوری‌که طول چرخه استروس در گروه VT به $6 \pm 0/95$



نمودار شماره ۱- میزان بیان رونوشت ژن‌های رگ‌زایی (VEGF, CD31, CD34)، یک چرخه استروس، پس از پیوند در دو گروه مختلف پیوندی. داده‌ها به‌صورت میانگین میزان بیان رونوشت ژن‌های رگ‌زایی نسبت به ژن β -ACT \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده‌اند. 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 معنی‌دار دارند ($P < 0/05$).

انجماد کل و یا قطعات بافت تخمدان، روش انجماد شیشه‌ای را نسبت به روش انجماد آهسته ترجیح می‌دهند [۷،۵]. از طرفی انتخاب یک پروتکل انجمادی به نوع و غلظت ضدیخ‌ها، دمای محلول‌های انجمادی و میزان نفوذپذیری آن‌ها، همچنین اندازه، ساختار و کیفیت بافت تخمدان بستگی دارد [۱۹]. با توجه به

بحث

موفقیت پیوند بافت تخمدان انجمادی، به عوامل مختلفی از جمله روش انجماد، محل پیوند و فاکتورهای محیطی بستگی دارد [۱]. به دلیل عدم تشکیل کریستال‌های یخ در روش انجماد شیشه‌ای و سرعت و آسانی این روش، برخی از محققان جهت

ایسکمی و آسیب‌های ناشی از آن می‌باشد. این مسأله حتی می‌تواند در افزایش کیفیت تخمک‌های به‌دست‌آمده از بافت پیوندی جهت لقاح و تولید جنین نقش بسزایی داشته باشد [۲۵]. سلیمانی و همکارانش نشان دادند که افزایش و یا تسریع در فرآیند رگ‌زایی در بافت تخمدان پیوندی با کاهش هایپوکسی بافت و درصد فولیکول‌های آپوتوتیک رابطه مستقیم دارد. این‌که هایپوکسی عامل اصلی و اولیه در شروع رگ‌زایی است، امروزه مورد قبول همگان است. مانند وضعیتی که در دوران جنینی برای رگ‌زایی در بدن جنین رخ می‌دهد. هنگامی‌که بافت دچار هایپوکسی می‌شود، عامل رشد اندوتلیال عروق خونی (VEGF) بیان می‌گردد. با بیان VEGF سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال عروق خونی شروع به مهاجرت کرده، برای ساخت یک رگ جدید آماده می‌شوند [۲۶]. VEGF که به‌عنوان عامل نفوذپذیری عروقی نیز شناخته می‌شود، خاصیت تحریک میتوز را دارد و می‌تواند سلول‌های اندوتلیالی را وادار به مهاجرت نماید [۲۷]. در کنار VEGF عوامل دیگری نیز در فرآیند رگ‌زایی دخالت می‌کنند؛ از جمله این موارد می‌توان به دو عامل مهم دیگر یعنی CD31 و CD34 اشاره نمود. CD31 یک عضو خانواده بزرگ ایمونوگلوبولین‌هاست و بر روی لوکوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود و در مهاجرت لوکوسیت‌ها، ارتباطات اینتگرینی و نیز رگ‌زایی دخالت می‌کند و به‌عنوان یک مارکر قابل‌اعتماد برای تشخیص تمایز سلول‌های اندوتلیال به کار می‌رود [۲۸]. CD34 نیز جزء خانواده سیالوموسین‌های عرض‌گشایی می‌باشد که بر روی سلول‌های هماتوپوئیتیک و سلول‌های وابسته به دستگاه عروقی، سلول‌های اندوتلیال و پیش‌سازهای اندوتلیالی بیان می‌شود [۲۸]. بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در رگ‌زایی در پایان اولین چرخه استروس پس از پیوند نشان داد که در مورد دو ژن CD34 و CD31 بین گروه‌ها از لحاظ آماری اختلاف معناداری وجود ندارد، اما در مورد ژن VEGF، سطح بیان در گروه VT به‌طور معناداری بالاتر از گروه VT+HA بود. این نتایج نشان می‌دهد که هیدروژل هیالورونیک اسید، علیرغم ایجاد هایپوکسی بیشتر در پایان اولین چرخه استروس، موفق به افزایش بیان ژن‌های رگ‌زایی نشده است. با توجه به این‌که ژن VEGF از فاکتورهایی است که در شروع رگ‌زایی بیان می‌شود و جزء فاکتورهای پروآنژیوژن است، این نتایج نشان می‌دهد که هیدروژل اسید هیالورونیک نتوانسته فرآیند رگ‌زایی را تسریع بخشد. در مطالعه‌ای که توسط همین تیم در سال ۲۰۱۶ انجام شد، نتایج نشان داد که در گروه دارای هیالورونیک اسید، رشد فولیکول‌ها و ذخایر تخمدانی به‌شدت کاهش داشته است که یکی از علل این کاهش می‌تواند

تفاوت ساختار و اندازه تخمدان گونه‌های جانوری مختلف، طراحی یک پروتکل انجمادی بهینه برای هر، گونه جانوری در کرایوبیولوژی حائز اهمیت است. مطالعات متعددی به بررسی پروتکل‌های انجماد شیشه‌ای و مقایسه اثرات ضدیخ‌های مختلف و طول مدت اثر محلول‌های انجمادی بر روی کل بافت تخمدان و یا قطعات تخمدانی پرداخته‌اند [۲۲-۲۰]. فتحی و همکارانش نشان دادند که ترکیب اتیلن‌گلیکول (EG) و DMSO همراه با سوکروز در مقایسه با سایر ترکیبات محلول‌های انجمادی، جهت انجماد شیشه‌ای کل بافت تخمدان رت مناسب‌تر است [۲۰]. Kagawa و همکارانش در سال ۲۰۰۹ محلول انجمادی، شامل ۷/۵ درصد EG + DMSO ۷/۱۵ + EG به مدت ۲۵ دقیقه و ۲۰ درصد EG + DMSO ۰/۵ + DMSO مول سوکروز به مدت ۱۵ دقیقه را برای قطعات تخمدان گاوی و انسانی استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که این ترکیب در بازگشت فعالیت تخمدانی پس از پیوند اتوگرافت بافت تخمدان گاوی موفق عمل کرده است [۱۷]. در سال ۲۰۱۳ Youm و همکارانش پروتکل انجمادی Kagawa را البته با زمان‌هایی کوتاه‌تر، به‌عنوان یک پروتکل بهینه برای بافت تخمدان کامل موش با سایز ۲×۲×۲ میلی‌متر ارائه دادند [۲۲]. در مطالعه حاضر با توجه به سایز تخمدان رت‌ها که حدود ۴×۴×۴ میلی‌متر بود و نیز متراکم و دندس‌تر بودن تخمدان رت نسبت به موش، روش انجمادی Kagawa جهت انجماد کل بافت تخمدان رت استفاده شد. نتایج نشان داد که بعد از گذشت یک چرخه از پیوند، در همه رت‌ها چرخه استروس برقرار شد. بنابراین این ترکیب در بازگشت چرخه استروس در رت نیز موفق عمل کرد. با توجه به این نتایج، روش Kagawa می‌تواند برای انجماد کل بافت تخمدان رت نیز مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر، پیوند بافت تخمدان، بدون آناستوموز عروقی به رشد عروق خونی جدید جهت بازگشت فعالیت تخمدانی و کاهش صدمات ایسکمیک وابسته است. با توجه به مطالعات انجام‌شده، بهبود کیفیت و کاهش آپتوز بافت تخمدان پیوندی می‌تواند از راه‌های مختلف، از جمله: استفاده از عوامل مؤثر در رگ‌زایی همچون فاکتورهای رشد [۲۳]، فیبرین [۷] و چسب اسید هیالورونیک [۲۴] حاصل شود. در مطالعه حاضر، هیدروژل اسید هیالورونیک با خاصیت رگ‌زایی، جهت سرعت‌بخشیدن به فرآیند آنژیوژنز، بازگشت چرخه استروس و حفظ ذخایر فولیکولی، پس از پیوند بافت تخمدان انجمادی رت استفاده شد. با این حال کاربرد هیدروژل اسید هیالورونیک به‌تنهایی در میزان موفقیت پیوند تغییری ایجاد نکرد و در هر دو گروه درصد موفقیت پیوند یکسان بود. مهم‌ترین نگرانی در رابطه با پیوند بافت تخمدان، مدت

بهبود رگ‌زایی پس از پیوند در کوتاه‌مدت ایفا نمی‌کند. اما با توجه به خاصیت رگ‌زایی هیالورونیک اسید ممکن است زمان بیشتری جهت افزایش بیان این ژن‌ها در گروه VT+HA لازم باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه تربیت مدرس، پژوهشگاه رویان و صندوق حمایت از پژوهشگران کمال تشکر را دارند.

به‌خاطر کاهش بیان ژن‌های رگ‌زایی و کاهش رشد عروق در گروه کپسوله‌شده با هیالورونیک اسید باشد [۱۸]. اما با توجه به خاصیت رگ‌زایی هیالورونیک اسید ممکن است زمان بیشتری جهت افزایش بیان این ژن‌ها در گروه VT+HA لازم بوده است. بنابراین پیشنهاد می‌شود بیان این ژن‌ها در زمانی طولانی‌تر پس از پیوند نیز ارزیابی شود.

نتیجه‌گیری

هیدروژل هیالورونیک اسید، نقش مؤثری جهت رشد و

References:

- [1] Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update* 2009; 15(6): 649-65.
- [2] Marin L, Bedoschi G, Kawahara T, Oktay KH. History, Evolution and Current State of Ovarian Tissue Auto-Transplantation with Cryopreserved Tissue: a Successful Translational Research Journey from 1999 to 2020. *Reprod Sci* 2020;1-8.
- [3] Donnez J, Dolmans M, Demyelle 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 Reprod* 2006; 21(1): 183-8.
- [4] Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update* 2001; 7(6): 526-34.
- [5] Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011; 23(2): 160-86.
- [6] Damos LL, Silva SMD, Lopes RAM, Sakano CRdSB, Simões MdJ, Montero EFdS. Study on the vaginal smear of rats submitted to autologous ovarian transplant: impact of remote ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras* 2009; 24(5): 387-92.
- [7] 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 fibroblast growth factor and fibrin hydrogel. *Hum Reprod* 2013: det296.
- [8] Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163(1): 125-9.
- [9] Liu L, Wood G, Morikawa L, Ayearst R, Fleming C, McKerlie C. Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Hum Reprod* 2008; 23(1): 122-8.
- [10] Israely T, Dafni H, Nevo N, Tsafiriri A, Neeman M. Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: Multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. *J Magn Reson Imaging* 2004; 20(4): 741-50.
- [11] Abir R, Stav D, Taieb Y, Gabbay-Benziv R, Kirshner M, Ben-Haroush A, et al. Novel extra cellular-like matrices to improve human ovarian grafting. *J Assist Reprod Genet* 2020; 1-13.
- [12] Shirazi-Tehrani A, Mazoochi T, Akhavan-Taheri M, Salehnia M. The effects of ovarian encapsulation with alginate hydrogel on morphology and follicular count of vitrified mouse ovary. *Feyz* 2019; 23(5): 467-75. [in Persian]
- [13] 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(7): e0134035.
- [14] Nepomnyashchaya EM, Ulianova EP, Sagakyants AB, Novikova IA, Vashchenko LN, Ausheva TV, et al. Factors of angiogenesis (VEGF and CD34) in primary and recurrent soft tissue sarcomas. *Am Soc Clin Oncol* 2020.
- [15] Fraser J, Laurent T, Laurent U. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997; 242(1): 27-33.
- [16] 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. *JID* 1994; 103(4): 576-9.
- [17] Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2009; 18(4): 568-77.
- [18] Akhavan Taheri M, Rezazadeh Valojerdi M, Ebrahimi B. Intramuscular autotransplantation of vitrified rat ovary encapsulated with hyaluronic acid hydrogel. *Biopreserv Biobank* 2016; 14(2): 114-21.
- [19] Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential

importance of vitrification in reproductive medicine. *Reprod Bio Online* 2002; 67(6): 1671-80.

[20] Fathi R, Valojerdi MR, Salehnia M. Effects of different cryoprotectant combinations on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrification of whole rat ovary. *Cryo Letters* 2013; 34(3): 228-38.

[21] Posillico S, Kader A, Falcone T, Agarwal A. Ovarian tissue vitrification: Modalities, challenges and potentials. *Curr Womens Health Rev* 2010; 6(4): 352-66.

[22] Youm HW, Lee JR, Lee J, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Hum Reprod* 2014; 29(4): 720-30.

[23] 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 Reprod Genet* 2013; 30(10): 1301-11.

[24] 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. *Biomed Mater* 2016; 11(5): 055006.

[25] Wu D, Lei Y, Tong Y, Tang F, Qian Y, Zhou Y. Angiogenesis of the Frozen-Thawed Human Fetal Ovarian Tissue at the Early Stage after Xenotransplantation and the Positive Effect of *Salviae miltiorrhizae*. *Anat Rec* 2010; 293(12): 2154-62.

[26] Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One* 2011; 6(4): e19475.

[27] Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, et al. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2001; 65(3): 879-89.

[28] Holmberg L, Iversen OE, Rudenstam CM, Hammar M, Kumpulainen E, Jaskiewicz J, et al. Increased risk of recurrence after hormone replacement therapy in breast cancer survivors. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(7): 475-82.