

اثر ۸ هفته تمرین شنا و تزریق سلول بنیادی بر برخی عوامل مؤثر در مسیر آنژیوژنز موش‌های مدل نارسایی زودرس تخمدان

غنچه صالحی^۱، دکتر پروین فرزانی^{۲*}، دکتر عبدالرضا جعفری^۳، دکتر فرزانه فرخی^۴

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۳. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۴. استادیار گروه علوم و فناوری‌های زیستی، دانشکده علوم پزشکی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

خلاصه

مقدمه: ناباروری زنان، یک وضعیت پزشکی جهانی است که می‌تواند ناشی از اختلالات مختلف دستگاه تناسلی از جمله نارسایی زودرس تخمدان باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۸ هفته تمرین شنا و تزریق سلول بنیادی بر ژن‌های VEGF، TGF و HGF بافت تخمدان موش‌های مدل نارسایی زودرس تخمدان انجام شد.

روش کار: در این تحقیق تجربی، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی ماده ۸-۶ هفته‌ای انتخاب شدند. به منظور ایجاد مدل نارسایی زودرس تخمدان، از داروی سیکلوفسفامید و بیوسولفان به ترتیب به میزان ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به صورت تزریق درون صفاقی استفاده شد. پس از القاء مدل، موش‌ها به صورت تصادفی به ۶ گروه (۵ سر در هر گروه) شامل: کنترل سالم، بیمار+ شم، بیمار+ سالین، بیمار+ سلول، بیمار+ ورزش و بیمار+ سلول+ ورزش تقسیم شدند. رت‌های گروه تمرین، در طی ۸ هفته به شنا پرداختند. گروه‌های سلول، ۲ هفته بعد از ایجاد مدل سلول‌های بنیادی به میزان یک میلیون سلول برای هر موش در تخمدان پیوند زده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی انجام شد. میزان p کمتر یا مساوی ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: القاء نارسایی زودرس تخمدان منجر به افزایش معنی‌دار ژن‌های VEGF، TGF و HGF بافت تخمدان رت‌ها نسبت به گروه کنترل- سالم شد ($p \leq 0/05$) که گروه‌های تمرین، سلول و تمرین+ سلول، بیان این ژن‌ها را نسبت به گروه بیمار و بیمار+ سالین کاهش دادند ($p \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: اثر هم‌افزایی تمرین هوازی و سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان باعث بهبود فاکتورهای رگ‌زایی رت‌های مدل تجربی نارسایی زودرس تخمدان می‌شود.

کلمات کلیدی: آنژیوژنز، تمرین شنا، سلول بنیادی مزانشیمی، نارسایی زودرس تخمدان

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر پروین فرزانی؛ دانشکده علوم انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران. تلفن: ۰۱۱-۳۳۰۳۳۷۹۴؛ پست الکترونیک: parvin.farzanegi@gmail.com

مقدمه

ناباروری زنان، یک وضعیت پزشکی جهانی است که می‌تواند ناشی از اختلالات مختلف دستگاه تناسلی از جمله نارسایی زودرس تخمدان (POF)^۱، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک^۲، اندومتريوز^۳، سندرم آشرمن^۴ و پره‌اکلامپسی^۵ باشد (۱). POF که نارسایی اولیه تخمدان نیز نامیده می‌شود، با آمنوره، هیپرگنادوتروپیسیم و کمبود استروژن و به دنبال آن ناباروری، قبل از ۴۰ سالگی ظاهر می‌شود. تخمین زده می‌شود که POF حدود ۱٪ از زنان در سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). با این حال، بروز آن در سال‌های اخیر افزایش یافته است (۳). POF یک اختلال ناهمگن به دلیل پاتوژنز چندعلتی است که شامل عوامل ژنتیکی، عفونی، آنزیمی و ایترورژنیک است. درمان‌های موجود برای POF کارایی پایینی دارند و ممکن است عوارض جانبی قابل توجهی ایجاد کنند و نیاز آشکار به درمان جامع‌تر برای بازگرداندن عملکرد تخمدان در مبتلایان به POF وجود دارد (۳).

محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG)^۶، عملکرد طبیعی غدد جنسی را از طریق مکانیسم بازخورد تنظیم می‌کند و بیماران مبتلا به POF معمولاً اختلال آشکاری در HPG دارند (۴). فرآندروژنیسم، یک مشخصه پاتوفیزیولوژیک کلیدی POF است و تزریق دوزهای زیادی از آندروژن‌ها به‌طور کلی برای القای یک مدل تجربی از POF هیپرآندروژنیک در موش استفاده می‌شود (۵). نارسایی زودرس تخمدان با التهاب مزمن درجه پایین و افزایش سطح آندروژن همراه است و این تغییرات به‌راحتی می‌تواند منجر به هیپرتروفی چربی شود (۶). این به نوبه خود آدیپوسیتوکین‌های مختلفی را آزاد می‌کند که در تنظیم متابولیسم لیپید، التهاب و فرآیندهای تولید مثلی نقش دارند و در نتیجه باعث افزایش سرم در نشانگرهای التهابی مانند فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α)، اینترلوکین-6 (IL-6) و پروتئین

واکنش‌گر C (CRP) می‌شود. افزایش این نشانگرها التهاب مزمن را تسریع می‌کنند و در نهایت منجر به یک‌سری اختلالات هورمون جنسی می‌شوند (۴). مطالعات نشان داده‌اند که ورزش ممکن است مقاومت بافت چربی را در برابر التهاب مزمن ناشی از چاقی از طریق مسیرهای سیگنالی مانند انسولین و فاکتور رشد بتا (TGF- β)^۷ افزایش دهد (۷)، و پاسخ‌های التهابی و ژن‌های مرتبط با التهاب را که با چاقی مانند TNF- α ، IL-6 و گیرنده‌های آن‌ها فعال می‌شوند، تنظیم کند (۸). ورزش، یک درمان توصیه شده برای نارسایی تخمدان است که به‌طور گسترده در بیماران در تمام سنین استفاده شده است. ورزش می‌تواند سطح آندروژن و انسولین را در POF کاهش دهد و محیط غدد درون‌ریز تخمدان را بهبود بخشد که نقش مهمی در افزایش تخمک‌گذاری دارد (۹). تمرین ورزشی می‌تواند به‌طور مؤثری وضعیت سلامت روانی بیماران مبتلا به POF را بهبود بخشد، زیرا اجرای آن بدون افزایش بار اقتصادی بیماران، با پذیرش بالای بیمار و عملکرد قوی، ساده و آسان است (۱۰). ارزش کاربرد ورزش درمانی با بهبود آشکار علائم، سطح طبیعی هورمون جنسی، بهبود وضعیت روانی و رضایت بالا، که شایسته ارتقاء و گسترش است، در بیماران مبتلا به POF بسیار بالاست (۱۱). فلیکس و همکاران (۲۰۱۸) اثرات مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE)^۸ و ورزش هوازی (۱۰ هفته) را بر روی قلب موش‌های صحرایی ماده مبتلا به POF مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که ورزش بدنی، اثرات مفیدی بر روی مورفولوژی و عملکرد قلب موش‌های ماده مبتلا به POF دارند (۱۲). سانتوس و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که فعالیت بدنی، استرس اکسیداتیو را در بافت چربی قهوه‌ای کاهش می‌دهد و باعث تغییر در ترکیب بدن و رفتار تغذیه‌ای در موش‌های مبتلا به POF می‌شود (۱۳).

از طرفی، چندین مطالعه آزمایشگاهی و کارآزمایی بالینی، سلول‌های بنیادی را به‌عنوان یک استراتژی برای درمان اختلال عملکرد تخمدان و اختلالات آندومتر

¹ premature ovarian failure

² polycystic ovary syndrome

³ endometriosis

⁴ Asherman syndrome

⁵ preeclampsia

⁶ Hypothalamic-pituitary-gonadal axis

⁷ Growth factor beta

⁸ Angiotensin converting enzyme

تمرین شنا و تزریق سلول بنیادی مزانشیمی بر برخی عوامل مؤثر در مسیر آنژیوژنز موش‌های مدل نارسایی زودرس تخمدان انجام شد.

روش کار

در این تحقیق تجربی، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار ۸-۶ هفته‌ای با میانگین وزنی $15/62 \pm 2/85$ گرم از انستیتو پاستور خریداری شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵٪ و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی-کربنات نگهداری شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1401.143 انجام و در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به تصویب رسید.

حیوانات از غذای پلت و آب که به‌صورت آزاد در اختیارشان قرار می‌گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزن کشی هفتگی به‌میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داشت. به‌منظور ایجاد مدل نارسایی زودرس تخمدان از داروی سیکلوفسفامید و بیوسولفان به‌ترتیب به‌میزان ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به‌صورت تزریق درون صفاقی استفاده شد (۲۱).

پس از القاء مدل در هر گروه، موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۶ گروه: (۱) کنترل سالم، (۲) بیمار+ شم، (۳) بیمار+ سالین، (۴) بیمار+ سلول، (۵) بیمار+ ورزش و (۶) بیمار+ سلول+ ورزش به‌تعداد ۵ سر در هر گروه تقسیم شدند (۲۱). گروه نارسایی زودرس تخمدان، ۲ هفته بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه (مدت ۸ هفته) باقی ماندند و گروه کنترل سالم به‌مدت ۸ هفته نگهداری شدند. رت-های گروه تمرین+بیمار، ۲ هفته بعد از ایجاد مدل، قبل از شروع پروتکل اصلی، به‌مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌منظور آشنایی با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار گرفتند. سپس ۵ روز در هفته تا پایان

دانسته‌اند که منجر به ناباروری می‌شود. به‌طور خاص، چندین مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)^۱ به‌عنوان یک رویکرد تجربی برای بازگرداندن عملکرد تخمدان و درمان ناباروری تمرکز کرده‌اند (۱۴). پتانسیل درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌دلیل تمایز آن به دودمان سلولی متعدد و تنظیم پاسخ‌های ایمنی از طریق تعدیل ایمنی است (۱۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند به سلول‌های اپی‌تلالیال، استرومایی و اندوتلیالیال تمایز پیدا کنند و نشان داده شده است که عملکرد آندومتر را بازیابی می‌کنند و نتایج بارداری را بهبود می‌بخشند (۱۶). چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که پیوند MSC، عملکرد تخمدان و ذخیره تخمدان را بهبود می‌بخشد و این عمل ممکن است توسط مسیرهای سیگنالینگ پاراکرین انجام شود (۱۷). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که اثر درمان باروری MSCs با ترشح آن‌ها مرتبط است، که سرشار از فاکتورهای فعال زیستی است که از عملکرد تخمدان حمایت می‌کنند (۱۸). این مولکول‌ها ممکن است شامل فاکتور رشد شبه انسولین (IGF)^۲، فاکتور رشد اندوتلیالیال عروقی (VEGF)^۳ و سایر فاکتورهای رشدی باشند که رشد سلولی، تمایز و تنظیم ایمنی را برای بازگرداندن عملکرد تخمدان تحریک می‌کنند (۱۹). فعالیت پاراکرین سلول‌های بنیادی مزانشیمی تأثیر قابل‌توجهی بر عملکرد تخمدان نسبت به اثرات تحریک‌کننده آن بر رشد و تمایز سلولی دارد (۱۹). شواهد رو به رشد در مطالعات حیوانی و آزمایش‌های بالینی اولیه نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق تعامل با سلول‌های ایمنی، اثرات تعدیل‌کننده ایمنی نیز دارند. نکته مهم این است که عملکرد پاراکرین MSC به‌شدت توسط مسیر سیگنالینگ RAPI/NF-k β تنظیم می‌شود (۲۰). با توجه به موارد مطرح‌شده و اثرات مفید فعالیت بدنی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر عملکرد تخمدان و این‌که تاکنون اثر ترکیبی این دو مداخله مورد پژوهش قرار نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۸ هفته

¹ Mesenchymal stem cells

² Insulin-like growth factor

³ Vascular endothelial growth factor

دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد ۵۰*۵۰*۱۰۰ سانتی‌متری با درجه حرارت ۳۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد، روزانه ۳۰ دقیقه با شدت ثابت ۶۰٪ ضربان بیشینه در طی ۸ هفته به شنا پرداختند (۲۲). هم‌چنین ۲ هفته بعد از ایجاد مدل در گروه بیمار+ سلول، سلول‌های بنیادی به‌میزان یک میلیون سلول برای هر موش در تخمدان پیوند زده شد (MSCs از مغز استخوان موش‌های ماده نژاد ویستار سالم (۳۰۰-۲۵۰ گرمی) پس از بیهوشی با کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) استخراج شد). روش کشت با تراکم پایین سلولی بوده که سلول‌ها با تراکم ۵۰-۶ سلول در هر سانتی‌متر مربع کشت داده شدند. پس از پر شدن نسبی سطح ظرف کشت؛ پاساژ صورت گرفت و مراحل فوق تا پاساژ ۳ یا ۴ که مجموعه خالصی از سلول‌هاست، تکرار گردید. MSCs جدا شده در محیطی با ^۱DMEM با ۲۰٪ ^۲FBS در طول یک شبانه‌روز برای انتخاب سلول‌های چسبان انکوبه شدند. کشت‌ها از محیط فلاسک هر ۳ روز تعویض شده تا سلول‌هایی که نجسبیده‌اند، جدا شوند و MSCs‌ها بعد از ۴-۳ بار پاساژ شدن به بیشتر از ۹۰٪ خلوص رسیده و به هدف پیوند انتخاب شدند). در گروه ترکیبی بیمار-سلول-تمرین، ۲ هفته بعد از القاء مدل نارسایی زودرس تخمدان، سلول‌های بنیادی به میزان یک میلیون سلول برای هر موش در تخمدان پیوند زده شد و پس از گذشت یک هفته از پیوند سلول، موش‌ها ۳۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته و به‌مدت ۸ هفته شنا انجام دادند. جهت حذف آثار حاد تمرین، نمونه‌برداری از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت؛ بدین‌منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس کشته شدند و پس از کشتار، بافت تخمدان جهت بررسی مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای این منظور نمونه‌های بافتی به فرمالین ۱۰٪ و نمونه‌های مربوط به بررسی ژن به تانک ازت منتقل

شدند. برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در هر گروه، بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج و به cdNA تبدیل گردید. سپس cdNA به روش PCR تکثیر شده و از تکنیک RT-qPCR جهت تأیید بیان ژن‌های مورد مطالعه به‌صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کيازول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن^۳ استخراج و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase Ifermentas قرار گرفت. علاوه بر این، جهت ارزیابی یکپارچگی RNA استخراج شده از ژل الکتروفور استفاده گردید. جهت استخراج RNA، ابتدا به تخمدان ۲۰۰-۳۰۰ لاندا کيازول اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، پلاک موجود در کراتیوپ در حالت نیمه انجماد توسط سر سمپلر خرد گردید، سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفورم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلول‌ها تماس بود. پس از یک دقیقه، محلول با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، محلول به سه فاز تقسیم شد: قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود، قسمت میانی لوله که سفید رنگ و حاوی بافت لیز شده بود، و قسمت پایینی لوله که صورتی و حاوی کيازول بود. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود، به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC^۴ شده، قرار داده شد. سپس ۱ سی‌سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به‌مدت ۱ دقیقه با دست به‌هم زده شد. ایزوپروپانول شفاف بوده و RNA نیز شفاف بود، اما وقتی این دو با هم مخلوط می‌شدند، مایع کدری را به‌وجود می‌آوردند. پس از افزودن ایزوپروپانول، نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ، مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی‌سی الکل ۷۰٪ اضافه

³ CinnaGen

⁴ Diethyl pyrocarbonate

¹ Dulbecco's Modified Eagle Media

² Fasting blood glucose

One) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به‌صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (TC)^۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول زیر:

$$R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

$$\Delta\Delta CT = (CT_{target} - CT_{reference})_{Time X} - (CT_{target} - CT_{reference})_{Time 0}$$

مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوپ خشک شد. به‌منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاند آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوپ ریخته شد. سپس به‌مدت ۵ دقیقه با سرسمبلر پپیتاز بر روی صفحه ۶۰ درجه قرار داده شد. هم‌چنین جهت تهیه cDNA تک‌رشته‌ای از پرایمر OligodtMWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شرمت فرمنتاز^۱) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix Applied Biosystems, Sequences Foster (ABI Step) Detection Systems. City CA و SYBER Green در دستگاه

منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل ۵ غلظت لگاریتمی به‌ترتیب رقیق شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم گردید. میزان بیان ژن هدف با ژن

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}}}{(E_{reference})^{\Delta CT_{reference}}}$$

$$(\Delta Ct_{reference} = Ct_{control} - Ct_{treatment}, \Delta Ct_{target} = Ct_{control} - Ct_{treatment})$$

میزان p کمتر یا مساوی ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه بر سطوح VEGF، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح VEGF در گروه‌های مختلف پژوهش بود (p=۰/۰۰۳). هم‌چنین بر اساس نتایج حاصل از جدول تعقیبی توکی (جدول ۱) و در سطح اطمینان ۰/۰۵، گروه‌های بیمار و بیمار-سالمین نسبت به گروه کنترل-سالم در سطوح VEGF افزایش معنی‌داری را نشان دادند (p<۰/۰۵). هم‌چنین گروه تمرین-سلول نسبت به گروه‌های بیمار و بیمار-

در فرمول فوق، E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به‌دست می‌آید. بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌های بافتی، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک و برای تعیین تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. سپس با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده‌ها از آزمون پارامتریک شامل آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی برای بررسی تغییرات ژن‌های هر گروه استفاده شد. تمام عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) انجام شد.

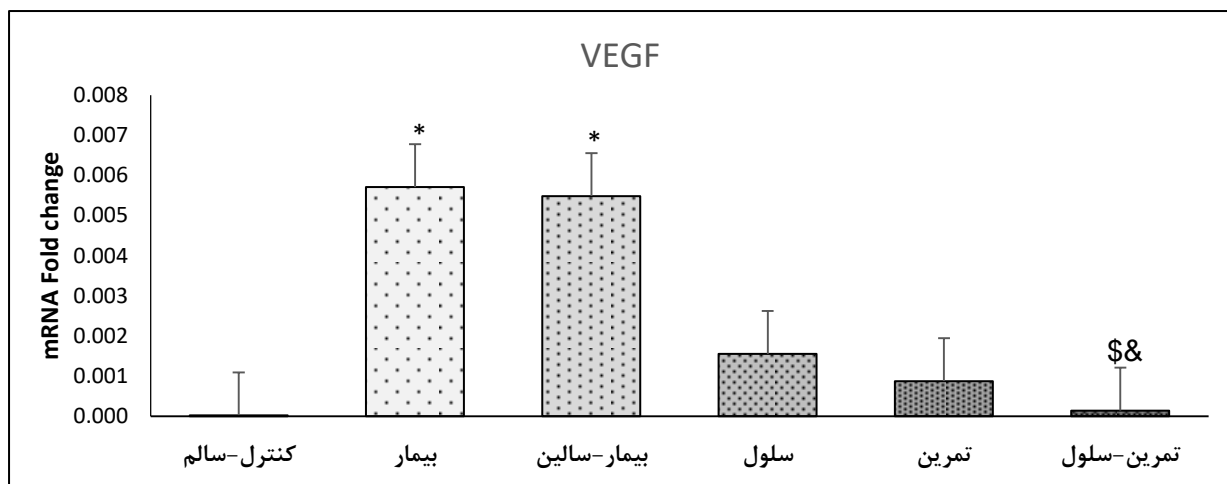
² Threshold Cycle

¹ Fermentas

سالمین در سطوح VEGF کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$) (نمودار ۱).
جدول ۱- نتایج آزمون تعقیبی توکی سطوح VEGF گروه‌های مختلف پژوهش

گروه	کنترل- سالم	بیمار	بیمار- سالمین	مکمل	تمرین	تمرین- مکمل
اختلاف میانگین	---	* ۰/۰۰۵۶۹-	* ۰/۰۰۵۴-	۰/۰۰۱۵-	۰/۰۰۰۸-	تمرین- مکمل
سطح معنی‌داری	---	۰/۰۲۵	۰/۰۳۴	۰/۹۳۸	۰/۹۹۵	۱/۰۰۰
اختلاف میانگین	---	---	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۴۱	۰/۰۰۴۸	* ۰/۰۰۵۵۷
سطح معنی‌داری	---	---	۱/۰۰۰	۰/۱۶۸	۰/۰۷۶	۰/۰۳۰
اختلاف میانگین	---	---	---	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۴۶	* ۰/۰۰۵۳۴
سطح معنی‌داری	---	---	---	۰/۲۱۴	۰/۱۰۰	۰/۰۴۰
اختلاف میانگین	---	---	---	---	۰/۰۰۰۶۸	۰/۰۰۱۴
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	۰/۹۹۸	۰/۹۵۵
اختلاف میانگین	---	---	---	---	---	۰/۰۰۰۷
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	---	۰/۹۹۸
اختلاف میانگین	---	---	---	---	---	---
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	---	---

* اختلاف معنی‌دار



نمودار ۱- مقایسه میانگین سطوح VEGF در گروه‌های مختلف پژوهش

* تفاوت معنادار در مقایسه با گروه کنترل- سالم، & تفاوت معنادار در مقایسه با گروه بیمار، & تفاوت معنادار در مقایسه با گروه بیمار- سالمین

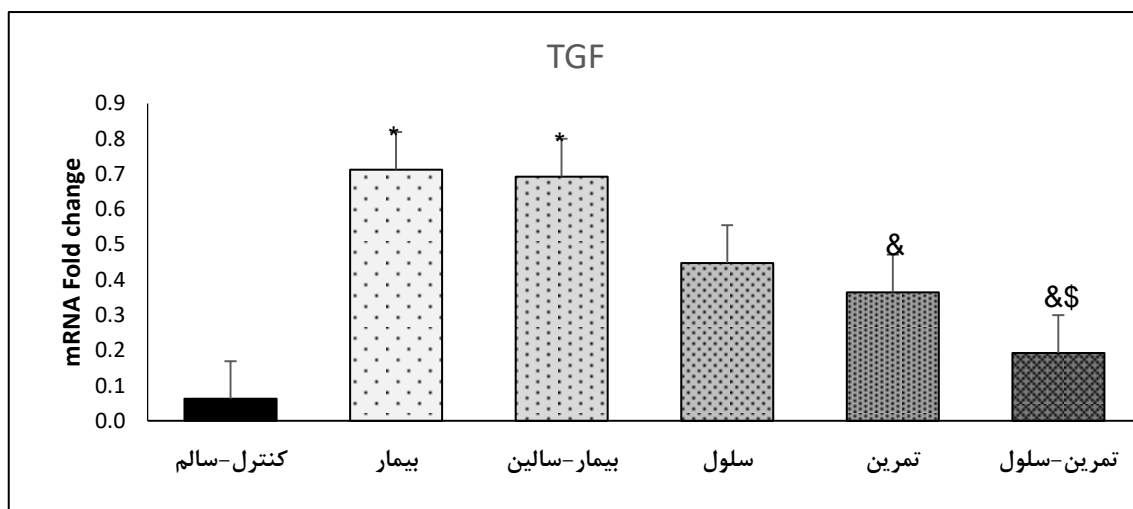
افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$). همچنین گروه‌های تمرین و تمرین- سلول نسبت به گروه بیمار و گروه تمرین- سلول نسبت به گروه بیمار- سالمین در سطوح TGF کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$) (نمودار ۲).

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه بر سطوح TGF، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح TGF در گروه‌های مختلف پژوهش بود ($p < 0.001$). همچنین بر اساس نتایج حاصل از جدول تعقیبی توکی (جدول ۲) و در سطح اطمینان ۰/۰۵، گروه‌های بیمار، بیمار- سالمین و مکمل نسبت به گروه کنترل- سالم در سطوح TGF

جدول ۲- نتایج آزمون تعقیبی توکی سطوح TGF گروه‌های مختلف پژوهش

گروه	کنترل- سالم	بیمار	بیمار- سالین	مکمل	تمرین	تمرین- مکمل
اختلاف میانگین	---	۰/۶۴۹*	۰/۵۳۳*	۰/۳۸۵*	۰/۳۰۲-	۰/۱۳۰-
سطح معنی‌داری	---	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۲۴	۰/۱۱۵	۰/۸۵۲
اختلاف میانگین	---	---	۰/۱۱۶	۰/۲۶۴	۰/۳۴۷*	۰/۵۱۹*
سطح معنی‌داری	---	---	۰/۹۰۱	۰/۲۱۲	۰/۰۵۰	۰/۰۰۱
اختلاف میانگین	---	---	---	۰/۱۴۸	۰/۲۳۱	۰/۴۰۳*
سطح معنی‌داری	---	---	---	۰/۷۷۳	۰/۳۴۱	۰/۰۱۶
اختلاف میانگین	---	---	---	---	۰/۰۸۳۲	۰/۲۵۵
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	۰/۹۷۵	۰/۲۴۵
اختلاف میانگین	---	---	---	---	---	۰/۱۷۲
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	---	۰/۶۴۹
اختلاف میانگین	---	---	---	---	---	---
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	---	---

* اختلاف معنی‌دار



نمودار ۲- مقایسه میانگین سطوح TGF در گروه‌های مختلف پژوهش

* تفاوت معنادار در مقایسه با گروه کنترل- سالم، & تفاوت معنادار در مقایسه با گروه بیمار، & تفاوت معنادار در مقایسه با گروه بیمار- سالین

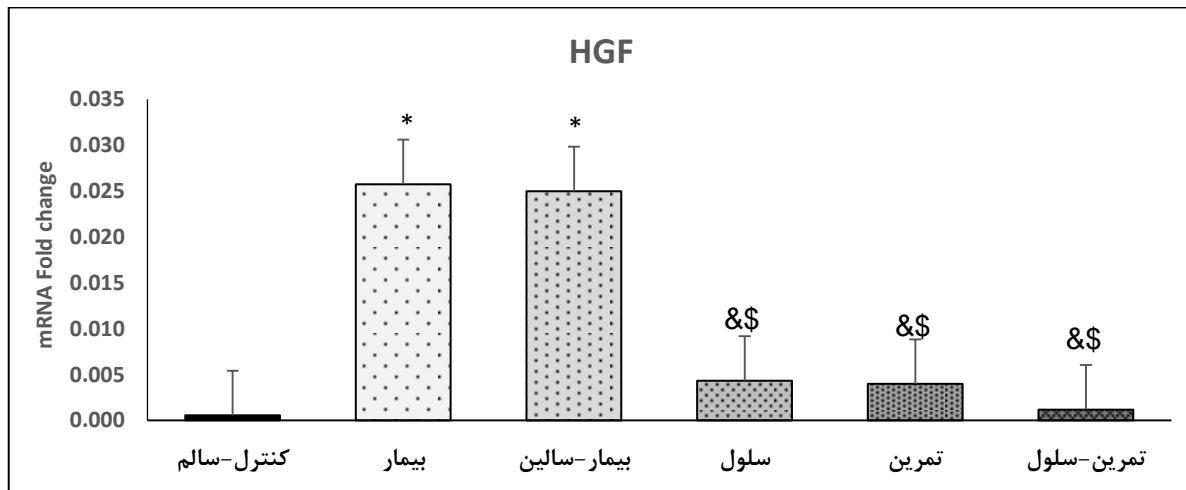
HGF افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$). همچنین گروه‌های سلول، تمرین و تمرین- سلول نسبت به گروه‌های بیمار و بیمار- سالین در سطوح HGF کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$) (نمودار ۳).

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه بر سطوح HGF نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح HGF در گروه‌های مختلف پژوهش بود ($p < 0.001$). همچنین (جدول ۳) در سطح اطمینان ۰/۰۵، گروه‌های بیمار و بیمار- سالین نسبت به گروه کنترل- سالم در سطوح

جدول ۳- نتایج آزمون تعقیبی توکی سطوح HGF گروه‌های مختلف پژوهش

گروه	کنترل- سالم	بیمار	بیمار- سالیین	مکمل	تمرین	تمرین- مکمل
اختلاف میانگین	---	*-/۰۲۵۱-	*-/۰۲۲۵-	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۴
سطح معنی‌داری	---	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
اختلاف میانگین	---	---	۰/۰۰۰۲۶	*-/۰۲۵۳*	*-/۰۲۵۶*	*-/۰۲۵۶*
سطح معنی‌داری	---	---	۰/۹۷۸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
اختلاف میانگین	---	---	---	*-/۰۲۲۶*	*-/۰۲۳۰*	*-/۰۲۳۰*
سطح معنی‌داری	---	---	---	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
اختلاف میانگین	---	---	---	---	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۳
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
اختلاف میانگین	---	---	---	---	---	۰/۰۰۰۸
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	---	۱/۰۰۰
اختلاف میانگین	---	---	---	---	---	---
سطح معنی‌داری	---	---	---	---	---	---

* اختلاف معنی‌دار



نمودار ۳- مقایسه میانگین سطوح HGF در گروه‌های مختلف پژوهش

* تفاوت معنادار در مقایسه با گروه کنترل- سالم،[§] تفاوت معنادار در مقایسه با گروه بیمار،[§] تفاوت معنادار در مقایسه با گروه بیمار- سالیین

بحث

در مطالعه حاضر القاء POF منجر به افزایش معنی‌دار ژن‌های HGF، TGF، VEGF و بافت تخمدان رت‌ها نسبت به گروه کنترل- سالم شد ($p \leq 0.05$)، که گروه‌های تمرین، سلول و تمرین+ سلول بیان این ژن‌ها را نسبت به گروه بیمار و بیمار سالیین کاهش دادند ($p \leq 0.05$) و کاهش در ژن VEGF تنها در گروه ترکیبی تمرین+ سلول معنی‌دار بود. پژوهشی که اثر فعالیت بدنی بر رگ‌زایی بافت تخمدان رت‌های مدل تجربی نارسایی زودرس تخمدان را بررسی کرده باشد

یافت نشد، در حالی که سانتوس و همکاران (۲۰۲۳) افزایش معنی‌دار در سطوح MPO و MDA را در رت‌های POF در مقایسه با گروه کنترل گزارش کردند، که در گروه POF + ورزش نسبت به گروه POF کاهش معنی‌دار داشت ($p \leq 0.05$). POF، ترکیب بدن و پارامترهای تغذیه‌ای را تغییر می‌دهد و باعث ایجاد تغییرات در استرس اکسیداتیو در BAT می‌شود، که فعالیت بدنی از این تغییرات جلوگیری می‌کند (۱۳). در مطالعه وو و همکاران (۲۰۱۹)، سطوح FINS در گروه POF+ورزش به‌طور معنی‌داری کمتر

نیاز به مطالعات بیشتری دارد. اثرات ورزش بر عملکرد سیستم ایمنی با شدت ورزش مرتبط است (۲۳). ورزش منظم و با شدت متوسط، عملکرد ایمنی بدن را تقویت می‌کند و مقاومت آن را در برابر بیماری‌های عفونی تقویت می‌کند (۲۴). با این حال، پس از تمرین‌های مکرر با شدت بالا یا تمرین طولانی‌مدت و با بار بالا، محققان عفونت‌های تحت بالینی و بالینی را در بدن به دلیل سرکوب سیستم ایمنی "موقت" یا "تجمعی" کشف کردند (۸). مطالعات تأیید کرده‌اند که ورزش هوازی با شدت کم تا متوسط (به‌عنوان مثال، پیاده‌روی سریع و شنا) می‌تواند میزان تخمک‌گذاری و بارداری زنان مبتلا به PCOS را افزایش دهد و چرخه قاعدگی، ترکیب بدن و متابولیسم را بهبود بخشد، اما هیچ تأثیری بر هیپرسوتیسم یا آکنه ناشی از هیپر آندروژنیسم ندارد (۲۵).

بافت چربی می‌تواند سیتوکین‌های مهمی مانند LP، TNF- α ، IL-6 و ADP را سنتز و ترشح کند. مشارکت در تنظیم متابولیسم گلوکز، متابولیسم لیپیدها و التهاب؛ و نقش کلیدی در بروز و توسعه سندرم متابولیک دارند (۲۶). مطالعات نشان داده‌اند که ورزش ممکن است بافت چربی را برای اعمال اثرات ضدالتهابی از طریق مسیرهای سیگنالی مانند انسولین و TGF- β تحریک کند و سطح TNF- α ، IL-6 و LP را کاهش دهد (۸). تأثیر ورزش بر بهبود متابولیسم غدد درون‌ریز با مقاومت لپتین مرکزی و محیطی مرتبط است. مطالعات نشان داده‌اند که ورزش می‌تواند مقاومت محیطی لپتین را با افزایش توده عضلانی و بافت چربی قهوه‌ای کاهش دهد و همچنین از بیان پروتئین‌های انتقال سیگنال لپتین کبدی و ماهیچه‌های اسکلتی جلوگیری کند (۲۷). علاوه بر این، ورزش می‌تواند مقاومت مرکزی لپتین را با تنظیم فعالیت عصبی هیپوتالاموس، تنظیم بیان پروتئین انتقال سیگنال لپتین در هیپوتالاموس و افزایش بیان IL-6 در هیپوتالاموس کاهش دهد (۲۸). نسبت ADP/LP به عنوان یک نشانگر زیستی عملکردی التهاب بافت چربی در مطالعات اخیر در نظر گرفته می‌شود و کاهش نسبت ADP/LP، نشان‌دهنده ناکارآمدی بافت چربی و

از گروه POF بود، در حالی که نسبت گلوکز خون ناشتا (FBG) به سطح سرمی انسولین ناشتا (FINS) در گروه POF+ورزش به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه POF بود. در مقایسه با گروه POF+ورزش، سطح سرمی TT (تستوسترون تام) در گروه POF به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. ضخامت غشای فولیکولی و تعداد فولیکول‌های آترزی در گروه POF+ورزش به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه POF بود. این نتایج نشان می‌دهد که ورزش، حساسیت به انسولین را افزایش و سطح آندروژن را کاهش می‌دهد. همچنین ورزش بر مورفولوژی تخمدان از جمله کاهش تعداد فولیکول‌های آترزی و ضخامت غشای فولیکولی تأثیر مثبت دارد (۹). در پژوهش دیگری لی و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که ورزش هوازی می‌تواند التهاب داخلی را با کاهش مقاومت به لپتین کاهش دهد و ممکن است با تأثیر بر محور هیپوفیز-تخمدان-هیپوتالاموس، اختلال هورمونی جنسی و هیپرآندروژنیسم را در موش‌های صحرایی POF کاهش دهد (۴).

استرس اکسیداتیو، حالت عدم تعادل بین اکسیداسیون و آنتی‌اکسیداسیون در بدن است. مطالعات نشان داده‌اند که هیپرآندروژنیسم می‌تواند حساسیت بدن به استرس اکسیداتیو را افزایش دهد و در نتیجه باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) و چربی‌های اکسید شده در بدن شود. علاوه بر این، باعث آتروفی تخمدان، اختلال در رشد فولیکولی، اختلالات بلوغ، آترزی فولیکولی و سایر ناهنجاری‌های ساختاری و عملکردی می‌شود که منجر به اختلالات تخمک‌گذاری می‌شود. در عین حال، برخی مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که استرس اکسیداتیو می‌تواند بیان سنتاز مرتبط با آندروژن را در تخمدان افزایش دهد، تولید و آزادسازی آندروژن را تحریک کند و در نهایت منجر به بروز POF شود (۴). ثابت شده است که ورزش، استرس اکسیداتیو و التهاب را مهار می‌کند، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن را تقویت می‌کند و عملکرد اندام‌ها و بافت‌ها را بهبود می‌بخشد. تعامل بین استرس اکسیداتیو و هیپرآندروژنیسم و هم-چنین مکانیسم آن به‌طور کامل مشخص نشده است که

افزایش التهاب سیستمیک می‌باشد (۲۹). گزارش شده است که LP با ADP همبستگی منفی و با عوامل پیش‌التهابی مانند TNF- α ، IL-6 و FFA همبستگی مثبت دارد. کاهش التهاب می‌تواند سطح ADP را تنظیم کند، بنابراین سنتز آندروستندینون را مهار می‌کند، سطح آندروژن سرم را کاهش می‌دهد و هیپراندرژیسم را کاهش می‌دهد (۳۰). در مطالعه حاضر نیز فعالیت بدنی منجر به کاهش معنی‌دار ژن‌های VEGF، TGF و HGF بافت تخمدان رت‌های POF گردید که ممکن است کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب که در اثر القای POF در رت‌ها ایجاد شده بود، از مکانیسم‌های اثرگذار باشد و از این طریق از ناباروری جلوگیری نماید.

چندین مطالعه، کاربرد MSCها را برای درمان باروری، به‌ویژه با بازگرداندن عملکرد تخمدان در زمینه اختلالات مختلف زنانه، مورد بررسی قرار داده‌اند (۳۱). miRNAها و انتقال اگزوزوم، مکانیسم جدیدی را نشان می‌دهند که توسط آن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق انتقال میتوکندری، یک بازیگر کلیدی درگیر در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی در سلامت و بیماری از جمله در POF، عملکردهایی را انجام می‌دهد. برخی از سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-6 و TNF- α ، می‌توانند آرایش مجدد اسکلتی MSC را القاء کنند و نانولول‌های تونل‌زنی (TNT)^۱ را تشکیل دهند که از طریق آن، تحرک میتوکندری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های همسایه مانند سلول‌های اپی‌تلیوم راه هوایی، کاردیومیوسیت‌ها و شبکه سلول‌های گانگلیونی رخ می‌دهد. اخیراً انتقال میتوکندری مبتنی بر التهاب سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های سیستم تولید مثل از جمله تخمک‌ها نیز گزارش شده است (۳۲). اثرات درمانی MSC و جهت انتقال میتوکندری، به شدت به محل قرارگیری MSC بستگی دارد. به‌نظر می‌رسد که یک محیط پیش‌التهابی می‌تواند انتقال میتوکندری MSC را به سلول‌های T افزایش دهد و به نوبه خود می‌تواند سلول‌های ایمنی را برای کنترل پاسخ التهابی آموزش

دهد (۳۳). یافته‌ها نشان داده‌اند که این سلول‌ها، تنها تعداد محدودی از سلول‌های هسته‌دار مغز استخوان را به‌دلیل چرخه تکثیر طولانی‌شان تشکیل می‌دهند. جالب توجه است BMSCها هم‌چنین توانایی تمایز به سلول‌های آندومتر، اندوتلیال و گرانولوزا (GCs) را دارند (۱).

بدوی و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش دادند که BMSCها، عملکرد تخمدان را در POF ناشی از سیکلوفسفامید بهبود می‌بخشد. درمان BMSC باعث بیان VEGF، افزایش سطح استرادیول، بازسازی ساختار تخمدان و کاهش بیان عامل آپوپتوز کاسپاز-۳ می‌شود (۳۴). در تحقیقات دیگری درمان BMSC باعث افزایش باروری و کاهش اختلال عملکرد تخمدان در موش‌ها پس از شیمی درمانی شد (۳۵). این اثرات قابل توجه BMSCها ممکن است به‌دلیل عوامل رگ-زایی و رشد ترشح شده از این سلول‌ها باشد (۲).

داده‌های قبلی نشان داده‌اند که درمان مبتنی بر BMSC، بیان VEGF را تنظیم می‌کند، رشد عروق خونی جدید را تقویت می‌کند و کیفیت پیوند تخمدان را در موش‌ها بهبود می‌بخشد (۳۶). علاوه بر این BMSCها، عملکرد تخمدان را در موش‌ها پس از شیمی‌درمانی بهبود بخشیدند و تعداد رگ‌های خونی جدید و فولیکول‌های تخمدان را افزایش دادند (۳۷). افزودن داربست کلاژن، حفظ کوتاه‌مدت BMSCها را در تخمدان موش‌های ماده مبتلا به POF در مقایسه با درمان BMSC به‌تنهایی افزایش داد (۳۸). علاوه بر این، BMSCها باعث افزایش تعداد فولیکول‌ها، بهبود تخمک‌گذاری و کاهش مرگ‌ومیر GCs در POF ناشی از سیکلوفسفامید می‌شوند (۲). در مطالعه کلیک و همکاران (۲۰۱۴) BMSCهای آلونژیک را از زنان مبتلا به اندومتريوز جدا کردند تا اثرات آن‌ها بر سلول‌های مشتق شده از اندومتريوز را در شرایط آزمایشگاهی بررسی کنند، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که BMSCهای آلونژیک نباید به‌عنوان یک استراتژی درمانی برای بیماران مبتلا به اندومتريوز استفاده شوند، زیرا ممکن است باعث رشد بافت آندومتر نابجا شوند و از توسعه اندومتريوز حمایت کنند (۳۹). جالب توجه

¹ Tunneling nanotubes

پوستی و هم در سلول‌های گرانولوزای تخمدان موش صحرایی بیان می‌شود، ممکن است عملکرد خود را به-عنوان تعدیل‌کننده روابط متقابل سلول‌های مزانشیمی-اپی‌تلیال بین سلول‌های theca و گرانولوزا با تسهیل تکثیر سلولی و تولید هورمون استروئیدی ایفا کند (۴۶). یک سیستم کامل HGF هم‌چنین از رشد سلول‌های گرانولوزا از طریق اثر ضد آپوپتوز پشتیبانی می‌کند (۴۷). علاوه بر این، مانند سایر سایتوکاین‌های مهم در تخمدان، IGF-1 در سلول‌های گرانولوزای در حال رشد و فولیکول‌های سالم بیان می‌شود که در فولیکول‌های آترتیک قابل تشخیص نیست و برای تکثیر سلول‌های گرانولوزا در مراحل اولیه فولیکولوژنز ضروری است (۴۸). با توجه به مطالعات (۴۹، ۵۰)، بیان IGF-1 تخمدانی تولید پروژسترون و استرادیول را تحریک می‌کند و با بهبود بیان گیرنده FSH، واکنش FSH سلول گرانولوزا را افزایش می‌دهد. کلین و همکاران (۱۹۹۶) گزارش دادند که سطح سرمی و مایع فولیکولی IGF-1 در زنان در سنین ۴۵-۴۰ ساله در سنین باروری در مقایسه با زنان جوان ۲۵-۲۰ ساله کاهش می‌یابد. بنابراین، IGF-1 نقش مهمی در رشد فولیکولی ایفا می‌کند (۵۱). علاوه بر این، مطالعه سونگ و همکاران (۲۰۱۶)، نشان داد که مقدار BMSC در بافت تخمدان موش اساساً بدون تکثیر آشکار برای حداقل ۸ هفته ثابت بود (۵۲)، که این با نتایج مطالعه لی و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت. هم غلظت هورمون سرم و هم بیان پروتئین‌های HGF، VEGF و IGF-1 تا ۲۸ روز پس از پیوند BMSC ثابت ماند. BMSCها می‌توانند سایتوکاین‌هایی مانند VEGF، HGF و TGF ترشح کنند. علاوه بر این، بیان تخمدانی VEGF، HGF و TGF به‌طور مشخص پس از پیوند BMSC به موش‌های POF افزایش یافت، لذا پیوند BMSC، عملکرد ذخیره تخمدانی موش‌های POF را از طریق مکانیسم پاراکرین بهبود می‌بخشد (۴۰).

است استفاده از BMSCها همراه با استروژن، باعث افزایش بازسازی آندومتر در مدل موش ماده مبتلا به سندرم آشرمن شد (۴۰). این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های BMSC، یکی از مهم‌ترین سلول‌های درمانی برای بازیابی عملکرد تخمدان هستند (۱).

لی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند در ۱۴، ۲۱، و ۲۸ روز پس از پیوند BMSC، بیان پروتئین‌های HGF، VEGF و IGF-1 تخمدان به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در همین حال، PCR و تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان داد که BMSCها ظرفیت ترشح سایتوکاین‌های HGF، VEGF و IGF-1 را دارند (۴۰).

رشد فولیکول به حمایت شبکه عروقی در تخمدان نیاز دارد، از این رو عروق استرومای تخمدان ناکافی ممکن است منجر به کاهش کیفیت تخمک با افزایش سن شود (۴۱). توسعه شبکه‌های عروقی در لایه سلولی فولیکول توسط سایتوکاین‌های رگ‌زایی القاء می‌شود. در تخمدان، عوامل رگ‌زایی تولید شده توسط سلول‌های گرانولوزا به حفظ عروق و سلامت فولیکول‌های غالب کمک می‌کند. یک مطالعه تحقیقاتی گزارش کرد که افزایش سن همراه با کاهش جریان خون استرومایی تخمدان، یک پدیده نسبتاً دیررس است که فقط در زنان بالای ۴۱ سال رخ می‌دهد (۴۰). در مورد سایتوکاین‌های رگ‌زا، VEGF یک میتوژن مؤثر برای اندوتلیوم عروقی است (۴۲) و هم‌چنین نفوذپذیری عروقی دیررس را تحریک می‌کند (۴۳). بهبود بیان VEGF در مرحله فولیکولی ممکن است در افزایش رگ‌زایی تخمدان و تعداد فولیکول‌های غالب که محکوم به تخمک‌گذاری هستند، مفید باشد (۴۰). علاوه بر این، VEGF یک عامل قوی بقاء برای آپوپتوز سلول گرانولوزای تخمدان و آترزی فولیکولی تخمدان است (۴۴). جدای از VEGF، HGF یک عنصر مهم از محیط داخلی فولیکولی است که باعث تسریع زنده ماندن فولیکول‌های در حال رشد و افزایش تکثیر اپی‌تلیوم سطح تخمدان می‌شود تا ناحیه آسیب‌دیده به‌دلیل بیرون راندن تخمک در طول تخمک‌گذاری را دوباره پر کند (۴۵). HGF که هم در سلول‌های

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی تمرین هوازی و سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان باعث بهبود فاکتورهای رگ‌زایی رت‌های مدل تجربی نارسایی زودرس تخمدان شد. با این وجود، تحقیقات صورت گرفته در این زمینه بسیار محدود است و برای مشخص شدن مکانیسم‌های دقیق و عوامل اثرگذار، نیاز به پژوهش‌های بیشتری در این زمینه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب رساله دکتری و با هزینه شخصی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انجام شد. بدین‌وسیله از این واحد دانشگاهی، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی را گزارش نکردند.

منابع

1. Esfandyari S, Chugh RM, Park HS, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal stem cells as a bio organ for treatment of female infertility. *Cells* 2020; 9(10):2253.
2. Zhang C. The roles of different stem cells in premature ovarian failure. *Current stem cell research & therapy* 2020; 15(6):473-81.
3. Chen L, Guo S, Wei C, Li H, Wang H, Xu Y. Effect of stem cell transplantation of premature ovarian failure in animal models and patients: a meta-analysis and case report. *Experimental and therapeutic medicine* 2018; 15(5):4105-18.
4. Li N, Yang C, Xie H, Liu Y, Liao Y. Effects of aerobic exercise on rats with hyperandrogenic polycystic ovarian syndrome. *International Journal of Endocrinology* 2021; 2021.
5. Walters KA, Bertoldo MJ, Handelsman DJ. Evidence from animal models on the pathogenesis of PCOS. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2018; 32(3):271-81.
6. Fuentes-Martin R, Moncayo S, Insenser M, Martínez-García MA, Luque-Ramirez M, Grau NA, et al. Glycoprotein A and B height-to-width ratios as obesity-independent novel biomarkers of low-grade chronic inflammation in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Journal of proteome research* 2019; 18(11):4038-45.
7. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2014; 1842(3):446-62.
8. Suzuki K. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise. *Biomolecules* 2019; 9(6):223.
9. Wu C, Jiang F, Wei K, Lin F, Jiang Z. Effects of exercise combined with finasteride on hormone and ovarian function in polycystic ovary syndrome rats. *International Journal of Endocrinology* 2019; 2019.
10. Lin J, Wu D, Jia L, Liang M, Liu S, Qin Z, et al. The treatment of complementary and alternative medicine on premature ovarian failure. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2021; 2021.
11. Li XT, Li PY, Liu Y, Yang HS, He LY, Fang YG, et al. Health-related quality-of-life among patients with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Quality of Life Research* 2020; 29:19-36.
12. Felix AC, Dutra SG, Gastaldi AC, Bonfim PC, Vieira S, de Souza HC. Physical training promotes similar effects to the blockade of angiotensin-converting enzyme on the cardiac morphology and function in old female rats subjected to premature ovarian failure. *Experimental Gerontology* 2018; 109:90-8.
13. Santos WL, da Silva Pinheiro C, de Oliveira Santos R, da Silva AC, Severo JS, Mendes PH, et al. Physical exercise alleviates oxidative stress in brown adipose tissue and causes changes in body composition and nutritional behavior in rats with polycystic ovary syndrome. *Life Sciences* 2023; 325:121754.
14. Naji A, Rouas-Freiss N, Durrbach A, Carosella ED, Sensébé L, Deschaseaux F. Concise review: combining human leukocyte antigen G and mesenchymal stem cells for immunosuppressant biotherapy. *Stem cells* 2013; 31(11):2296-303.
15. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and molecular life sciences* 2020; 77:2771-94.
16. Rungsiwut R, Virutamasen P, Pruksananonda K. Mesenchymal stem cells for restoring endometrial function: An infertility perspective. *Reproductive Medicine and Biology* 2021; 20(1):13-9.
17. Harrell CR, Fellbaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells* 2019; 8(5):467.
18. Ling L, Feng X, Wei T, Wang Y, Wang Z, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. *Stem cell research & therapy* 2019; 10:1-8.
19. Zhao YX, Chen SR, Su PP, Huang FH, Shi YC, Shi QY, et al. Using mesenchymal stem cells to treat female infertility: an update on female reproductive diseases. *Stem cells international* 2019; 2019.

20. Montenegro ML, Bonoche CM, Meola J, Portella RL, Ribeiro-Silva A, Brunaldi MO, et al. Effect of physical exercise on endometriosis experimentally induced in rats. *Reproductive Sciences* 2019; 26(6):785-93.
21. Abedy Ghehi F, Fathi R, Abtahi NS, Eivazkhani F, Bahrehbar K, Abed Heidari E, et al. Germ cells Markers Expression in Mouse Premature Ovarian Failure Model. *Pathobiology Research* 2019; 22(3):149-57.
22. Shahidian Akbar F, Farzanegi P, Abbaszadeh H. Effect of a period of swimming exercise and vitamin E intake on catalase and superoxide dismutase activity, and malondialdehyde levels in ovarian tissue of endometriosis model rats. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* 2020; 23(9):43-51.
23. Ticinesi A, Lauretani F, Tana C, Nouvenne A, Ridolo E, Meschi T. Exercise and immune system as modulators of intestinal microbiome: implications for the gut-muscle axis hypothesis. *Exercise immunology review* 2019; 25.
24. Benham JL, Yamamoto JM, Friedenreich CM, Rabi DM, Sigal RJ. Role of exercise training in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Clinical obesity* 2018; 8(4):275-84.
25. Dyck DJ. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 2009; 34(3):396-402.
26. Tremblay A, Dutheil F, Drapeau V, Metz L, Lesour B, Chapier R, et al. Long-term effects of high-intensity resistance and endurance exercise on plasma leptin and ghrelin in overweight individuals: The RESOLVE Study. *Applied physiology, nutrition, and metabolism* 2019; 44(11):1172-9.
27. Moro T, Tinsley G, Bianco A, Marcolin G, Pacelli QF, Battaglia G, et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *Journal of translational medicine* 2016; 14(1):1-10.
28. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J. Adiponectin-leptin ratio: a promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte* 2018; 7(1):57-62.
29. Tojek K, Anaszewicz M, Szukay B, Czerniak B, Socha E, Lis K, et al. Circulating leptin, adiponectin, and tumor necrosis factor-alpha in patients undergoing surgery due to colorectal cancer. *Digestion* 2021; 102(2):246-55.
30. Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell stem cell* 2015; 17(1):11-22.
31. Wang ZB, Hao JX, Meng TG, Guo L, Dong MZ, Fan LH, et al. Transfer of autologous mitochondria from adipose tissue-derived stem cells rescues oocyte quality and infertility in aged mice. *Aging (Albany NY)* 2017; 9(12):2480.
32. Court AC, Le-Gatt A, Luz-Crawford P, Parra E, Aliaga-Tobar V, Bátiz LF, et al. Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO reports* 2020; 21(2):e48052.
33. Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, Amal S, Raafat N, Shabrawy SM, et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy* 2013; 15(1):64-75.
34. Badawy A, Sobh MA, Ahdy M, Abdelhafez MS. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *International journal of women's health* 2017; 441-7.
35. Damous LL, Nakamuta JS, Saturi de Carvalho AE, Carvalho KC, Soares-Jr JM, Simoes MD, et al. Does adipose tissue-derived stem cell therapy improve graft quality in freshly grafted ovaries?. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2015; 13(1):1-1.
36. Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, et al. Cell therapy for chemically induced ovarian failure in mice. *Stem Cells International* 2014; 2014.
37. Su J, Ding L, Cheng J, Yang J, Li XA, Yan G, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagen scaffolds restores ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction* 2016; 31(5):1075-86.
38. Abomaray F, Gidlöf S, Bezubik B, Engman M, Götherström C. Mesenchymal stromal cells support endometriotic stromal cells in vitro. *Stem cells international* 2018; 2018.
39. Kilic S, Yuksel B, Pinarli F, Albayrak A, Boztok B, Delibasi T. Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2014; 31:975-82.
40. Li J, Mao Q, He J, She H, Zhang Z, Yin C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem cell research & therapy* 2017; 8(1):1-1.
41. Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human reproduction update* 2008; 14(2):131-42.
42. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-9.
43. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587):983-5.
44. Kosaka N, Sudo N, Miyamoto A, Shimizu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 2007; 363(3):733-7.

45. Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. Regulation of vascular endothelial growth factor-A and its soluble receptor sFlt-1 by luteinizing hormone in vivo: implication for ovarian follicle angiogenesis. *Fertility and sterility* 2008; 89(4):922-6.
46. Ito M, Harada T, Tanikawa M, Fujii A, Shiota G, Terakawa N. Hepatocyte growth factor and stem cell factor involvement in paracrine interplays of theca and granulosa cells in the human ovary. *Fertility and sterility* 2001; 75(5):973-9.
47. Uzumcu M, Pan Z, Chu Y, Kuhn PE, Zachow R. Immunolocalization of the hepatocyte growth factor (HGF) system in the rat ovary and the anti-apoptotic effect of HGF in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reproduction* 2006; 132(2):291-9.
48. Kadakia R, Arraztoa JA, Bondy C, Zhou J. Granulosa cell proliferation is impaired in the Igf1 null ovary. *Growth Hormone & IGF Research* 2001; 11(4):220-4.
49. Taketani T, Yamagata Y, Takasaki A, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on progesterone production in human luteinized granulosa cells. *Fertility and sterility* 2008; 90(3):744-8.
50. Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Molecular endocrinology* 1997; 11(13):1924-33.
51. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB, Branigan EF, Giudice LC, Soules MR. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996; 81(5):1946-51.
52. Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. *BioMed Research International* 2016; 2016.

The effect of 8 weeks of swimming training and stem cell injection on some effective factors in the angiogenesis pathway of premature ovarian failure model rats

Ghoncheh Salehi¹, Parvin Farzanegi^{2*}, Abdolreza Jafari³, Farzane Farokhi⁴

1. PhD student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, School of Humanities, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
2. Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Humanities, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, School of Humanities, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Biological Sciences and Technologies, School of Medical Sciences, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

Received: Sep 27, 2023 Accepted: Dec 28, 2023

Abstract

Introduction: Female infertility is a universal medical condition that can be caused by various disorders of the reproductive system, including premature ovarian failure. The present study was performed with aim to investigate the effect of 8 weeks of swimming training and stem cell injection on VEGF, TGF and HGF genes in the ovarian tissue of premature ovarian failure model rats.

Methods: In this experimental research, 30 female rats 6- to 8-week-old were selected. In order to create a model of premature ovarian failure, cyclophosphamide and biosulfan were used in the amount of 100 and 50 mg/kg, respectively, as an intraperitoneal injection. After model induction, rats were randomly divided into 6 groups (5 heads in each group) including: 1) healthy control, 2) patient+ sham, 3) patient+ saline, 4) patient+ cell, 5) patient +exercise and 6) patient+ cell+ exercise. The rats of the training group swam for 8 weeks. Cell groups, 2 weeks after creating the model stem cells were transplanted in the ovary at the rate of one million cells for each mouse. Data analysis was done using SPSS statistical software (version 22) and one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests. $P \leq 0.05$ was considered significant.

Results: Induction of premature ovarian failure led to a significant increase in VEGF, TGF and HGF genes in the ovarian tissue of rats compared to the control-healthy group ($P \leq 0.05$) that the exercise, cell and exercise+ cell groups decreased the expression of these genes compared to the patient and patient-saline groups ($P \leq 0.05$).

Conclusion: The synergistic effect of aerobic exercise and bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve angiogenic factors in experimental premature ovarian failure model rats.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Premature ovarian failure, Swimming training

► Please cite this article as:

Salehi Gh, Farzanegi P, Jafari A, Farokhi F. The effect of 8 weeks of swimming training and stem cell injection on some effective factors in the angiogenesis pathway of premature ovarian failure model rats. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2023; 26(10):43-57. DOI: 10.22038/IJOGI.2023.74197.5815

