



Effects of Ghrelin on Bax and Bcl-2 Expression in the Ovary of Female Rats with Induced Ischemia-Reperfusion Injury

Fazel Sadeghian¹ , Arash Kheradmand² , Ghasem Farjani Kish³ , Roohollah Dehghani Tafti² 

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram Abad, Iran

² Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram Abad, Iran

³ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram Abad, Iran

Received: ..., Reciver in revised from: ..., Accepted: ..., Available online: ...

 [10.22059/jvr.2025.395436.3510](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.395436.3510)

J Vet Res, Volume 81, Number 1, 2026, ...

Abstract

BACKGROUND: Ovarian torsion is an emergency condition caused by the rotation of the ovary around its axis, leading to reduced blood flow, ischemia, and tissue necrosis. Ghrelin, a hormone with multiple physiological roles including apoptosis modulation and cell death regulation, has been proposed as a potential agent for managing ischemia-reperfusion injury (IRI) in the ovary.

OBJECTIVES: This study aimed to investigate the effects of ghrelin on the expression of pro-apoptotic factor (Bax) and anti-apoptotic factor (Bcl-2) in the ovaries of rats subjected to IRI.

METHODS: In this experimental study, 21 female rats were randomly assigned into three groups: Sham (no IRI induction, received intraperitoneal normal saline post-surgery), Ischemia (with IRI induction, treated with normal saline), and Ghrelin (with IRI induction, treated with ghrelin). Ghrelin was administered intraperitoneally at a dose of 10 nmol, 30 minutes before IRI induction and simultaneously with torsion. After completion of the experiment, ovarian samples were collected for immunohistochemical evaluation of Bax and Bcl-2 expression.

RESULTS: Ghrelin group showed a significant decrease in Bax expression in corpus luteum, stroma, granulosa, and theca cells, and a significant increase in granulosa and theca cells compared to the ischemia group ($P < 0.05$), but no significant changes were observed in corpus luteum and stroma cells ($P > 0.05$). Histopathological assessments revealed relative tissue improvement with reduced inflammation and necrosis in the ghrelin group compared to the ischemia group.

CONCLUSIONS: The findings suggest that ghrelin exerts a protective effect against IRI-induced ovarian injury by reducing apoptotic cell death. Therefore, ghrelin may serve as a promising therapeutic adjunct for managing complications related to ovarian torsion.

Keywords: Bax, Bcl-2, Ghrelin, Ischemia-Reperfusion, Ovary

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Arash Kheradmand, Tel/Fax: +9866-33120109.



How to cite this article:

...

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Bax expression in the ovarian cells of rats. (A) theca cells, (B) granulosa cells, (C) corpus luteum cells, (D) stroma cells. Data are presented as mean \pm standard error. The graphs show a significant increase in the ischemia group compared to the sham group ($P < 0.0001$), a significant decrease in the Ghrelin group compared to the ischemia group ($P < 0.001$), and a significant increase in the Ghrelin group compared to the sham group ($P < 0.01$).

Figure 2. Bax expression in ovarian cells of rats in three groups using immunohistochemical staining (400 \times magnification). (A) stroma cells for the sham group, (B) stroma cells for the ischemia group, (C) granulosa cells (left arrow) and theca cells (right arrow) for the ischemia group, (D) granulosa cells (lower arrow) and theca cells (upper arrow) for the ghrelin group. The arrows indicate positively stained cells. Bar = 50 μ m.

Figure 3. Bcl-2 expression in the ovarian cells of rats. (A) theca cells, (B) granulosa cells, (C) corpus luteum cells, (D) stroma cells. Data are presented as mean \pm standard error. The graphs A and B show a significant decrease in the ischemia group compared to the sham group ($P < 0.0001$), a significant increase in the Ghrelin group compared to the ischemia group ($P < 0.0001$), and a significant increase in the ghrelin group compared to the sham group ($P < 0.0001$). The graphs C and D show no statistically significant differences among the groups.

Figure 4. Bcl-2 expression in ovarian cells of rats in three groups using immunohistochemical staining (400 \times magnification). (A) granulosa cells for the sham group, (B,C) theca cells for the ischemia group, (D) granulosa cells (two upper arrows) and theca cells (lower arrow) for the ghrelin group. The arrows indicate positively stained cells. Bar = 50 μ m.



بررسی بیان فاکتورهای Bax و Bcl-2 متعاقب تزریق گرلین در ایسکمی - رپرفیوژن تجربی در تخمدان موش صحرایی

فاضل صادقیان^۱، آرش خردمند^۲، قاسم فرجانی کیش^۳، روح‌الله دهقانی نفتی^۲

^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
^۲ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ... تاریخ بازنگری: ... تاریخ پذیرش: ... تاریخ انتشار: ...

doi: 10.22059/jvr.2025.395436.3510

دوره ۸۱، شماره ۱، ۱۴۰۴، ...

چکیده

زمینه مطالعه: پیچ‌خوردگی تخمدان یک وضعیت اورژانسی است که به دلیل چرخش تخمدان حول محور خود به کاهش خون‌رسانی، ایسکمی و نکروز بافتی منجر می‌شود. هورمون گرلین با نقش‌های فیزیولوژیک متعدد، از جمله تعدیل آپوپتوز و کنترل مرگ سلولی، به عنوان یک عامل بالقوه در مدیریت آسیب‌های ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن تخمدان مطرح شده است.

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات هورمون گرلین بر بیان فاکتورهای آپوپتوتیک Bax و ضدآپوپتوتیک Bcl-2 در تخمدان موش‌های صحرایی تحت شرایط ایسکمی - رپرفیوژن انجام شد.

روش کار: در مطالعه آزمایشی حاضر، ۲۱ سر موش صحرایی ماده به سه گروه شامل گروه شم (بدون القای ایسکمی - رپرفیوژن و دریافت نرمال سالیین بعد از جراحی)، گروه ایسکمی (ایجاد ایسکمی - رپرفیوژن و درمان با نرمال سالیین) و گروه گرلین (ایجاد ایسکمی - رپرفیوژن و درمان با گرلین) تقسیم شدند. گرلین با دوز ۱۰ نانومول، نیم‌ساعت قبل از ایسکمی و هم‌زمان با تورشن، به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از اتمام آزمایش، نمونه‌های تخمدان جهت ارزیابی ایمونوهیستوشیمی بیان Bax و Bcl-2 مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: مطابق یافته‌های مطالعه، در گروه گرلین، بیان Bax در سلول‌های جسم زرد، استروما، گرانولوزا و تکا نسبت به گروه ایسکمی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$) و بیان Bcl-2 در سلول‌های گرانولوزا و تکا به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0/05$). با این حال تغییر معنی‌داری در بیان Bcl-2 در سلول‌های جسم زرد و استروما مشاهده نشد ($P < 0/05$). علاوه بر این گروه گرلین در مقایسه با گروه ایسکمی، بهبود نسبی بافت تخمدان همراه با کاهش التهاب و نکروز را نشان داد.

نتیجه‌گیری نهایی: یافته‌ها بیانگر آن است که گرلین با کاهش مرگ سلولی ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن، می‌تواند به عنوان یک عامل محافظتی در پیچ‌خوردگی تخمدان مؤثر باشد؛ بنابراین استفاده از گرلین به عنوان یک مکمل درمانی، می‌تواند راهکاری جدید برای کاهش آسیب‌های تخمدانی ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن محسوب شود.

کلمات کلیدی: ایسکمی - رپرفیوژن، Bax، Bcl-2، تخمدان، گرلین

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: آرش خردمند، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

مقدمه

پیچ‌خوردگی تخمدان به چرخش تخمدان دور خط میانی که شامل لیگامنت‌ها توبواورین (Tubo Ovarian ligament) و اینفاندیبولوپلوپیک (Infundibulopelvic ligament) می‌باشد، گفته می‌شود. این بیماری به دلیل کاهش خون‌رسانی به تخمدان می‌تواند ایسکمی ایجاد کرده و باعث نکروز بافتی و به تبع آن ناباروری شود (۱، ۲). کیست‌های تخمدانی، اویداکت با طول بلند و سندرم تحریک بیش‌ازحد تخمدان (OHSS)، از فاکتورهای مستعدکننده پیچ‌خوردگی تخمدان می‌باشد. از علائم بالینی شایع این بیماری می‌توان به درد در ناحیه لگن، تهوع و استفراغ اشاره

کرد. تشخیص این بیماری براساس علائم بالینی امکان پذیر نیست و تنها در برخی مواقع با کمک سونوگرافی داپلر تشخیص داده می شود. درمان این بیماری، مداخله جراحی بوده که در آن تخمدان به حالت طبیعی بازمی گردد. هرچند در صورت وجود بافت نکروزه، احتمال ایجاد ایسکمی رپر فیوژن به دلیل بازگشت خون رسانی وجود دارد (۳، ۴).

گرلین (Ghrelin) یک هورمون پپتیدی است که از مخاط معده ترشح می شود، اما در بافت های مختلف نیز بیان می شود. عملکرد بیولوژیکی گرلین به طور گسترده ای شناخته شده است، از جمله تنظیم مصرف غذا، وزن بدن، دستگاه گوارش، قلب و عروق، تولیدمثل، عملکردهای ایمنی، تکثیر سلولی و ترشح هورمون. گیرنده ترشح کننده هورمون رشد (GHS-R) اثر گرلین را واسطه می کند. بسته به نوع سلول، گرلین یا آپوپتوز را القا می کند یا اثر ضد آپوپتوز دارد (۵). همچنین نشان داده شده است این هورمون بر روی گنادها نیز حاوی گیرنده می باشد (۶، ۷). مطالعات نشان داده اند گرلین در تعدیل آپوپتوز در سلول های کاردیومیوسیت، سلول های بتا پانکراس، هیپوفیز و چربی نقش دارد. همچنین پیش بینی می شود گرلین روند مرگ سلولی و تکثیر در بیضه و تخمدان را کنترل کند (۸).

خانواده BCL-2 دارای جفت های مختلفی از پروتئین های آنتاگونیست و آگونیست است که آپوپتوز را تنظیم می کند و وابسته بودن عملکرد این دو به یکدیگر نامشخص است. طی یک مطالعه با استفاده از رویکردی ژنتیکی، از مدل های افزایش و کاهش عملکرد Bcl-2 و Bax، نشان داده شد بیان ژن Bax در غیاب Bcl-2 باعث آپوپتوز می شود و در مقابل، بیان بیش از حد Bcl-2 همچنان آپوپتوز را در غیاب Bax سرکوب می کند (۹).

خانواده پروتئین های Bcl-2 نقش کلیدی در تنظیم آپوپتوز، از طریق تعادل بین اعضای پیش آپوپتوتیک، مانند Bax و ضد آپوپتوتیک مانند Bcl-2 ایفا می کند. مطالعات ژنتیکی اخیر نشان داده اند بیان Bax می تواند به طور مستقل و حتی در غیاب Bcl-2، مسیرهای آپوپتوز را فعال کند، در حالی که Bcl-2 قادر است بدون حضور Bax نیز با مکانیسم های جایگزین، آپوپتوز را مهار کند (۹). این تعاملات پیچیده فراتر از مدل سنتی هتروداایمریاسیون بوده و شامل تعاملات با سایر پروتئین های غشایی و تنظیم پتانسیل غشای میتوکندری است که بقای سلولی را تضمین می کند (۱۰).

نقش پروتئین های Bcl-2 و Bax در تنظیم آپوپتوز سلولی در بافت تخمدان از اهمیت بالایی برخوردار است. در بافت سالم تخمدان، تعادل بین این دو پروتئین برای حفظ هموستاز سلولی ضروری است. مطالعات نشان می دهند در شرایط پاتولوژیک تخمدانی، کاهش سطح Bax و افزایش بیان Bcl-2 به کاهش آپوپتوز و بقای غیرطبیعی سلول های اکتوپیک منجر می شود که به پیشرفت بیماری کمک می کند (۱۱). در مطالعات بافت های هیپرپلاستیک و نئوپلاستیک تخمدان، اختلال در تعادل بیان این دو مارکر با تغییرات در گیرنده های استروژن و پروژسترون مرتبط است که نشان دهنده تعامل پیچیده بین مسیرهای هورمونی و آپوپتوتیک در پاتوژنز بیماری ها است (۱۲). این یافته ها اهمیت این مارکرها را در مطالعات بیماری های تخمدان برجسته می کند.

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی فاکتورهای آپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک در تخمدان موش صحرایی سالم و تعیین میزان بیان پپتیدهای Bax و Bcl-2 در تخمدان موش صحرایی متعاقب به ایسکمی رپر فیوژن و همچنین تزریق گرلین در آن ها است.

مواد و روش کار

حیوانات موردمطالعه: در مطالعه حاضر، از ۲۱ سر موش صحرایی ماده با میانگین وزنی 200 ± 50 گرم، در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد، تحت شرایط نوری استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، همراه با رطوبت نسبی محیط ۴۰ تا ۶۰ درصد و امکان دسترسی به غذا و آب کافی استفاده شد. موش ها در مطالعه حاضر به ۳ گروه ۷ تایی تقسیم شدند:

گروه شم: در این گروه ایسکمی رپر فیوژن تخمدان القا نشد. موش ها پس از انجام جراحی شکمی، به صورت داخل صفاقی ۱۰۰ میکرولیتر نرمال سالین دریافت کردند.

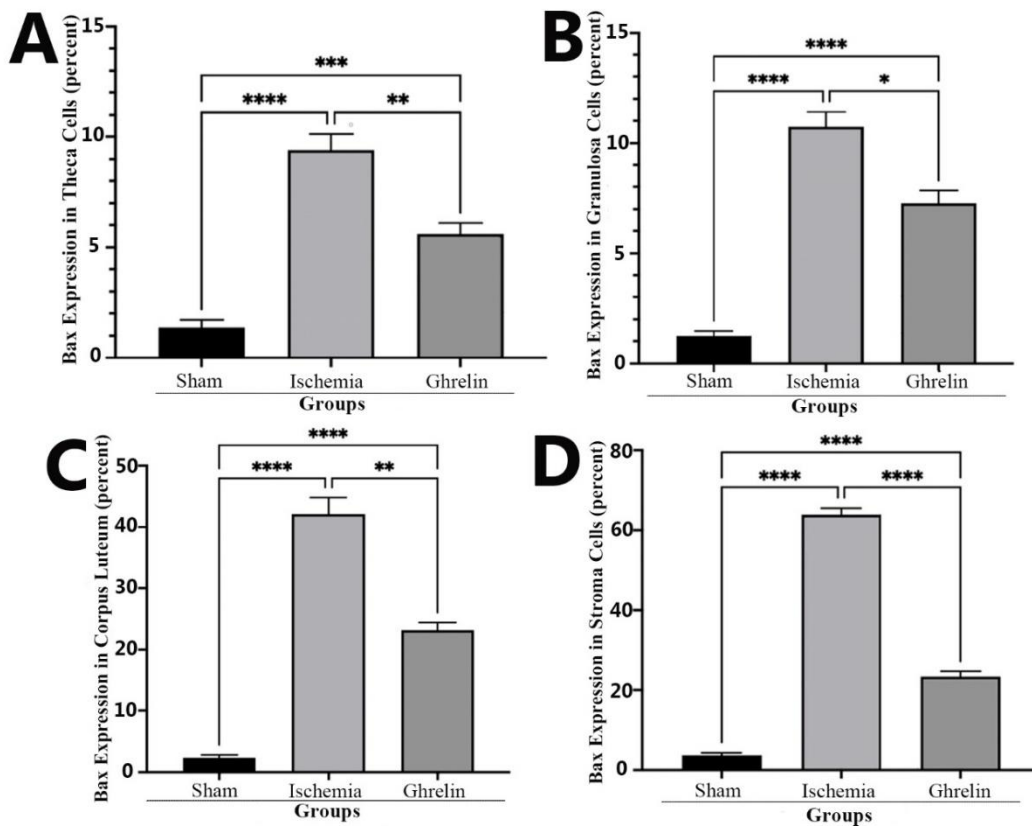
گروه ایسکمی: در این گروه موش ها، میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول نرمال سالین به صورت درون صفاقی، نیم ساعت قبل از ایجاد ایسکمی و هم زمان با رپر فیوژن دریافت کردند.

گروه گرلین: گرلین با دُز ۱۰ نانومول به ازای هر موش به صورت درون صفاقی، نیم ساعت قبل از ایجاد ایسکمی و هم زمان با رپر فیوژن تزریق شد.

مراحل ایجاد ایسکمی - رپر فیوژن: در هر سه گروه مورد مطالعه قبل از جراحی، موش‌ها تحت بیهوشی با ترکیب کتامین ۱۰ درصد (آلفاسان، هلند) با دُز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲ درصد (رویان دارو، ایران) با دُز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند. سپس ناحیه شکم تراشیده و تحت شرایط آسپسی، برشی به طول ۲/۵ الی ۳ سانتی متر روی خط میانی شکم ایجاد شد.

در گروه شم، پس از برش محوطه شکمی و پس از کمی دستکاری تخمدان، شکم با استفاده از نخ نایلون سه صفر بخیه شد. در گروه‌های ایسکمی و گرلین، تخمدان‌ها با استفاده از پنس خون بند به میزان ۷۲۰ درجه حول محور رباط‌های توبو اورین چرخانده شدند. پنس در تمام مدت ۲ ساعت روی پایک‌های عروقی باقی ماند تا ایسکمی پایدار ایجاد شود. برای محافظت از موضع جراحی در این مدت، تامپون استریل بر روی تخمدان قرار داده شد. پس از پایان این مدت، پنس برداشته شد تا رپر فیوژن آغاز گردد. در نهایت، در موش‌ها با تزریق داخل قلبی داروی سولفات منیزیم، آسان کشی صورت گرفت و سپس بافت تخمدان جهت بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی برداشته شد. نمونه‌های اخذ شده تا زمان آزمایشات بعدی در فرمالین بافره نگهداری شدند.

تهیه گرلین: رقیق سازی گرلین (Tocris Cook Son Ltd., Bristol, UK) با نرمال سالین صورت گرفت و محلول مورد نظر با نسبت ۱۰ نانومول گرلین در هر ۱۰۰ میکرولیتر از هورمون رقیق شده تهیه شد. انتخاب دُز گرلین بر اساس واحد نانومول به دلیل ماهیت پپتیدی این ترکیب و وزن مولکولی آن (تقریباً ۳۳۷۰ دالتون) صورت گرفت. استفاده از واحد مولار در مطالعات دارویی رایج است، زیرا امکان محاسبه دقیق تر غلظت و مقایسه بهتر با مطالعات سلولی و فارماکولوژیک را فراهم می کند. مطالعات پیشین نیز دُزهای مشابهی را با همین واحد برای ارزیابی اثرات سیستمیک گرلین در مدل‌های ایسکمی - رپر فیوژن در موش گزارش کرده‌اند (۱۳).



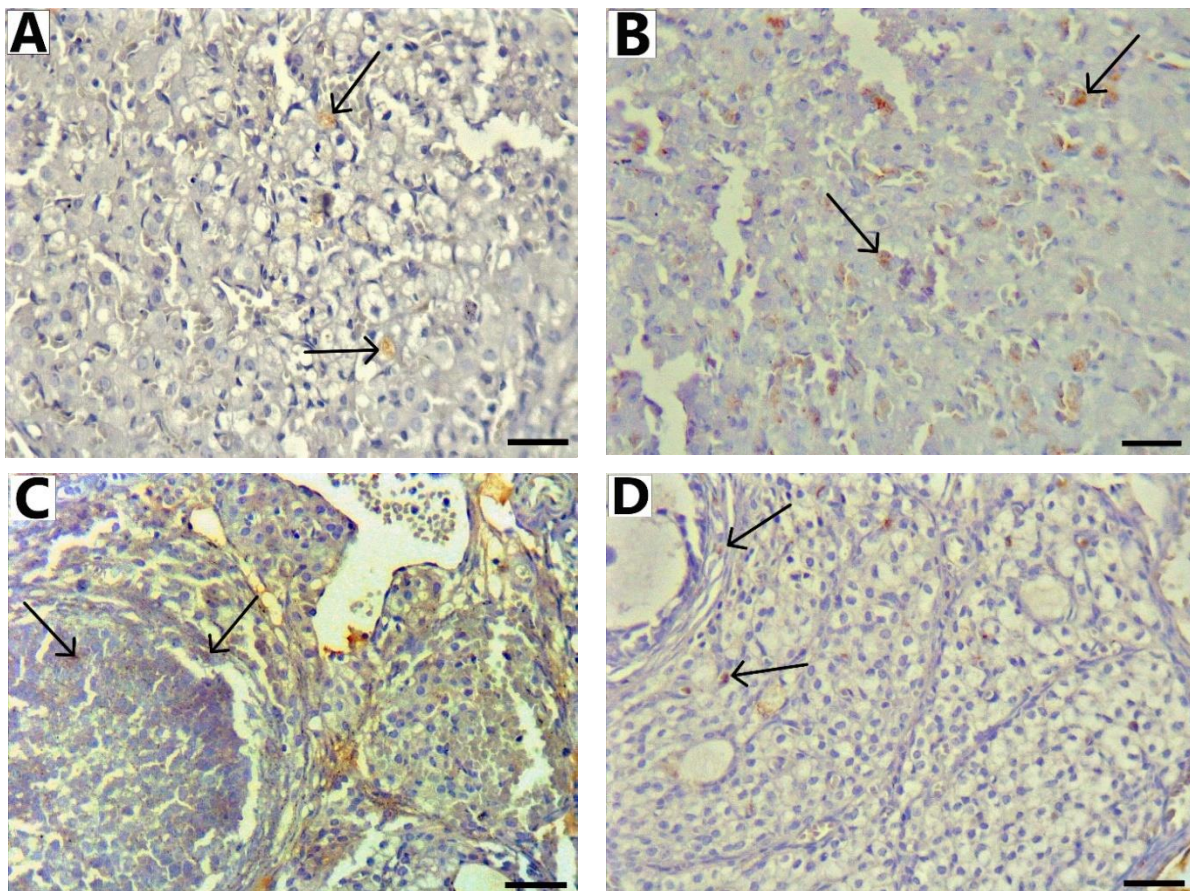
تصویر ۱. نمودارهای بیان Bax در سلول‌های تخمدان موش صحرائی. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده‌اند. A. بیان Bax در سلول‌های تکا B. بیان Bax در سلول‌های گرانولوزا C. بیان Bax در سلول‌های جسم زرد D. بیان Bax در سلول‌های استروما در نمودارها ایسکمی باعث افزایش بسیار معنی‌دار بیان Bax نسبت به گروه شم شده است ($P < 0.001$). گرلین غلظت این پپتید را به طور معنی‌داری نسبت به گروه ایسکمی کاهش داده است ($P < 0.01$). باین حال گرلین به تنهایی نیز باعث افزایش معنی‌دار بیان Bax نسبت به گروه شم شده است ($P < 0.01$).

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی: جهت تهیه لام بافتی، پاساژ نمونه‌های اخذشده صورت گرفت. سپس از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه گردید و مقاطعی با ضخامت ۳ میلی‌متر تهیه شد. پس از آن، مراحل پارافین‌زدایی و آب‌گیری انجام و نمونه‌ها در محلول بازیافت آنتی‌ژن Tris-EDTA غوطه‌ور و در حمام حرارتی (۹۸ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. جهت متوقف کردن پراکسیداز درون‌زا، نمونه‌ها با پراکسید هیدروژن (۳٪ H₂O₂) در محلول PBS به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و در PBS از سرم خرگوش سالم (۵ درصد) جهت جلوگیری از رنگ‌آمیزی غیراختصاصی زمینه، استفاده شد. نمونه‌ها با آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. از کیت‌های رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مارکر Bcl-2 و Bax (Biocare، ایالات متحده آمریکا) جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نمونه‌ها استفاده شد.

تحلیل آماری: برای استخراج داده‌های کمی، در هر اسلاید بافتی، ۱۰ میدان دید تصادفی در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. تعداد سلول‌های رنگ‌پذیر مثبت برای مارکرهای Bcl-2 و Bax به صورت دستی و توسط دو مشاهده‌گر کور (blinded observers) شمارش شد.

داده‌ها جهت ترسیم نمودار در نرم‌افزار Microsoft Excel وارد و برای هر گروه به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) نشان داده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱۰ انجام گرفت. برای داده‌های دارای توزیع نرمال، از آزمون ANOVA یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای داده‌هایی که توزیع غیرنرمال داشتند معادل غیرپارامتری ANOVA یک‌طرفه یعنی آزمون کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis test) انجام شد. همچنین برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post-hoc test) استفاده شد. سطح معنی‌داری در مطالعه حاضر ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

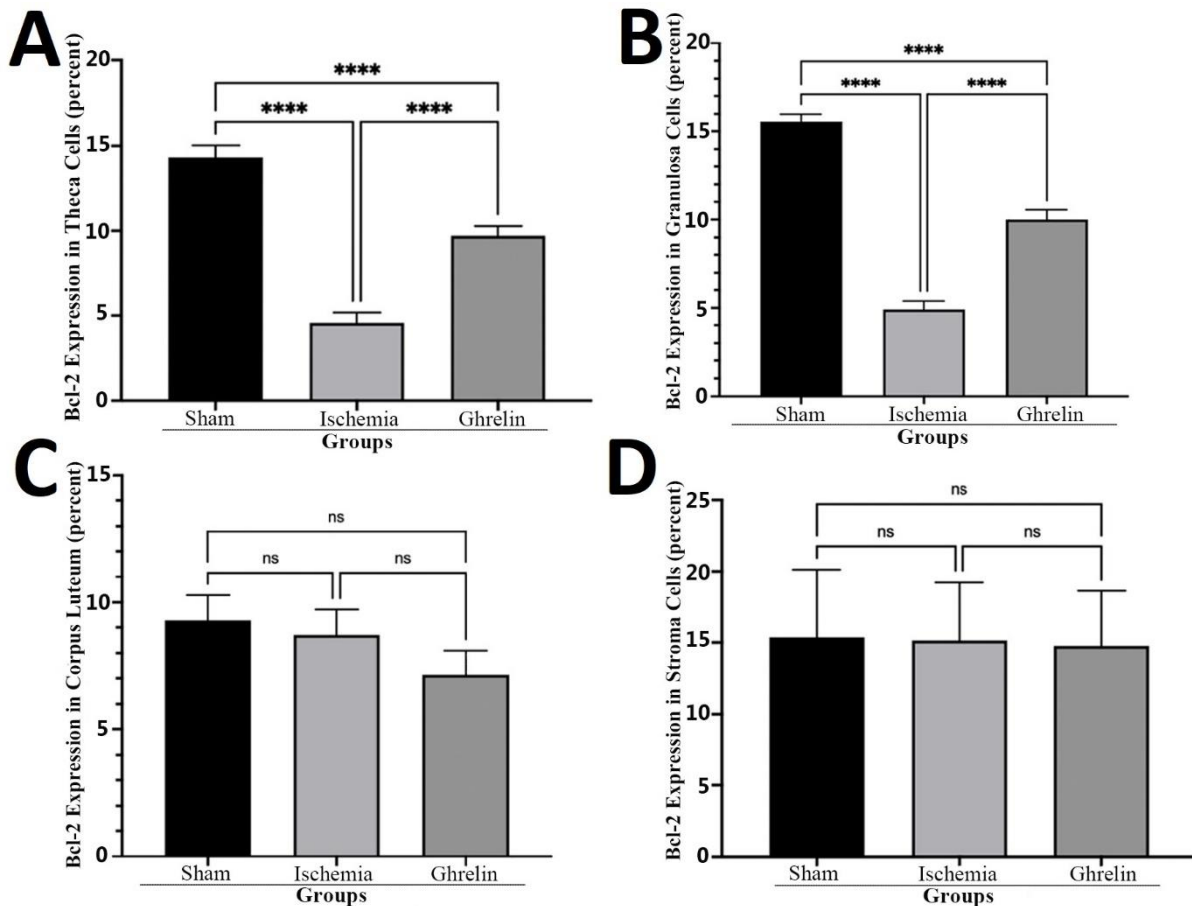


تصویر ۲. بیان Bax در سلول‌های تخمدان موش صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه شم، ایسکمی و گرلین با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی. A. گروه شم در سلول‌های استروما (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر). B. گروه ایسکمی در سلول‌های استروما (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر). C. گروه ایسکمی در سلول‌های گرانولوزا (فلش چپ) و تکا (فلش راست). D. گروه گرلین (درمان) در سلول‌های گرانولوزا (فلش پایین) و تکا (فلش بالا) (فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌های رنگ‌گرفته می‌باشند). مقیاس = ۵۰ میکرومتر.

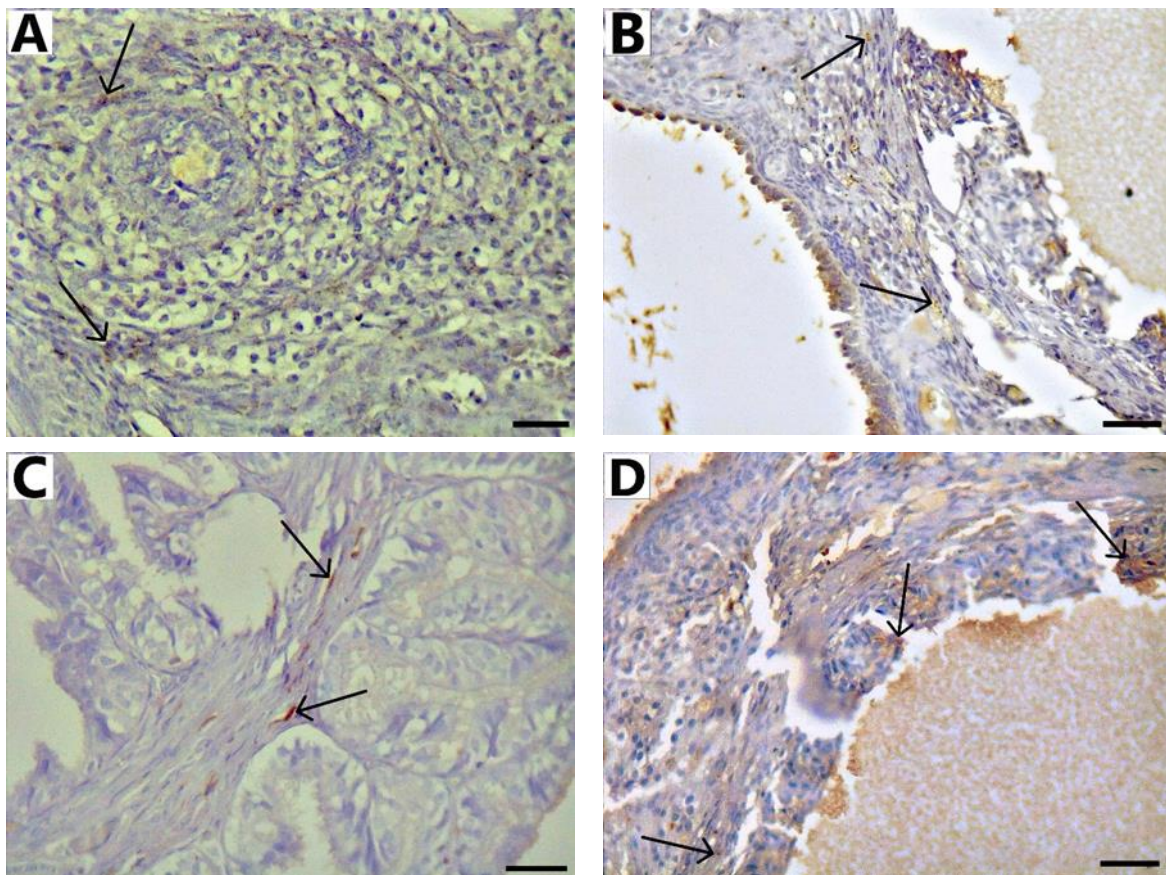
نتایج

بیان پروتئین Bax در سلول‌های تکا: همان‌طور که در تصویر ۱، نمودار A نشان می‌دهد، ایسکمی به افزایش معنی‌دار بیان Bax در سلول‌های تکا تخمدان نسبت به گروه شم ($P < 0/0001$) منجر گردید. این یافته حاکی از آن است که ایسکمی به‌طور قابل‌توجهی فرایند آپوپتوز در سلول‌های تکا را تحریک کرده است. در گروه تحت درمان با گرلین، این افزایش در بیان Bax به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/0001$) که نشان‌دهنده اثر محافظتی گرلین در مهار آپوپتوز ناشی از ایسکمی است. باین‌حال در گروه گرلین، بیان Bax هنوز نسبت به گروه شم به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0/01$) که می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر نسبی درمان باشد.

بیان پروتئین Bax در سلول‌های گرانولوزا: همان‌طور که در تصویر ۱، نمودار B نشان می‌دهد، القای ایسکمی به افزایش معنی‌دار بیان Bax در سلول‌های گرانولوزای تخمدان نسبت به گروه شم ($P < 0/0001$) منجر شد. این یافته حاکی از آن است که ایسکمی به‌طور قابل‌توجهی فرایند آپوپتوز را در سلول‌های گرانولوزا تحریک کرده است. در گروه تحت درمان با گرلین، این افزایش در بیان Bax به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P < 0/0001$) که نشان‌دهنده اثر محافظتی گرلین در مهار آپوپتوز ناشی از ایسکمی است. باین‌حال، در گروه گرلین، بیان Bax همچنان نسبت به گروه شم به‌طور معنی‌داری بالاتر است ($P < 0/05$) که می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر نسبی درمان باشد. این نتایج به‌طور کلی نشان‌دهنده اثر مثبت گرلین در کاهش آپوپتوز ناشی از ایسکمی است.



تصویر ۳. نمودارهای بیان Bcl-2 در سلول‌های تخمدان موش صحرائی. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده‌اند. A. بیان Bcl-2 در سلول‌های تکا B. بیان Bcl-2 در سلول‌های گرانولوزا C. بیان Bcl-2 در سلول‌های جسم زرد D. بیان Bcl-2 در سلول‌های استروما در نمودارهای A و B. القای ایسکمی باعث کاهش بسیار معنی‌دار بیان Bcl-2 در سلول‌های تکا و گرانولوزا در مقایسه با گروه شم شده است ($P < 0/0001$) که نشان‌دهنده اثر منفی شدید ایسکمی بر این پروتئین محافظت‌کننده سلولی و احتمال افزایش آپوپتوز است. تجویز گرلین به‌طور قابل‌توجهی بیان Bcl-2 را نسبت به گروه ایسکمی افزایش داده است ($P < 0/0001$) که بیانگر معکوس کردن اثرات منفی ایسکمی و محافظت از سلول‌ها در برابر آپوپتوز توسط گرلین است. باین‌حال، میزان بیان Bcl-2 در گروه شم به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه تحت درمان با گرلین است ($P < 0/0001$)؛ اما در نمودارهای C و D نتایج نشان داد هیچ تفاوت آماری معنی‌داری (ns) بین گروه‌های شم، ایسکمی و گرلین در میزان بیان Bcl-2 در سلول‌های استروما و جسم زرد وجود نداشت.



تصویر ۴. بیان Bcl-2 در سلول‌های تخمدان موش صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه شم، ایسکمی و گرلین با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی. A. گروه شم در سلول‌های گرانولوزا (بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر). B, C. گروه ایسکمی در سلول‌های تکا (بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر). D. گروه گرلین (درمان) در سلول‌های گرانولوزا (دو فلش بالا) و تکا (فلش پایین) (فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌های رنگ‌گرفته می‌باشند). مقیاس = ۵۰ میکرومتر.

بیان پروتئین Bax در سلول‌های جسم زرد: ایسکمی به افزایش قابل توجه بیان Bax در سلول‌های جسم زرد تخمدان نسبت به گروه شم منجر گردید ($P < 0/0001$) و به‌وضوح در **تصویر ۱**، نمودار C این موضوع مشخص است. همچنین این تغییر نشان‌دهنده تحریک شدید فرایند آپوپتوز در این سلول‌ها در اثر ایسکمی است. تجویز گرلین به کاهش معنی‌دار بیان Bax در مقایسه با گروه ایسکمی منجر شد ($P < 0/0001$) که نشان‌دهنده اثر محافظتی این پپتید در مهار آپوپتوز ناشی از ایسکمی است. با این حال، در گروه گرلین، بیان Bax هنوز نسبت به گروه شم به‌طور معنی‌دار بالاتر بود ($P < 0/01$) که نشان می‌دهد گرلین نمی‌تواند به‌طور کامل اثرات ایسکمی را از بین ببرد و سطح Bax را به حد نرمال گروه شم برگرداند.

بیان پروتئین Bax در سلول‌های استروما: همان‌طور که در **تصویر ۱**، نمودار D مشاهده می‌شود، القای ایسکمی موجب افزایش بسیار معنی‌دار بیان Bax در سلول‌های استروما در مقایسه با گروه شم شده است ($P < 0/0001$) که نشان‌دهنده افزایش شدید آپوپتوز ناشی از ایسکمی در این سلول‌هاست. در گروه تحت درمان با گرلین، بیان Bax به‌طور قابل توجهی کاهش یافت ($P < 0/0001$) که بیانگر نقش محافظتی گرلین در تعدیل پاسخ‌های سلولی به فرایند ایسکمیک است. با این حال سطح بیان Bax در گروه گرلین همچنان به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شم باقی مانده است ($P < 0/05$). این موضوع نشان می‌دهد اگرچه گرلین اثر تعدیل‌کننده مطلوبی دارد، اما قادر به بازگرداندن کامل سطح آپوپتوز به حالت نرمال نبوده است.

همچنین در تصاویر ایمونوهیستوشیمی مربوط به بیان Bax (**تصویر ۲**)، توزیع و شدت بیان پروتئین Bax در سلول‌های تخمدان در گروه‌های مختلف تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. در گروه (شم)، سلول‌ها دارای مورفولوژی طبیعی با هسته‌های مشخص و سیتوپلاسم یکنواخت بوده و رنگ‌پذیری بسیار ضعیفی برای Bax نشان می‌دهند که بیانگر سطح پایه و فیزیولوژیک این پروتئین در

شرایط طبیعی است. در گروه (ایسکمی)، علاوه بر تغییرات ساختاری، مانند نامنظم شدن غشای سلولی و تراکم کروماتین، افزایش قابل توجه رنگ آمیزی قهوه‌ای در سراسر سلول مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده افزایش چشمگیر بیان Bax و شروع روندهای آپوپتوتیک می‌باشد. در گروه (گرلین)، شدت رنگ آمیزی Bax نسبت به گروه ایسکمی کاهش یافته و سلول‌ها تا حدودی ویژگی‌های مورفولوژیک طبیعی خود را بازیافته‌اند، هرچند هنوز نسبت به گروه شم بیان بالاتری از Bax را نشان می‌دهند.

بیان پروتئین Bcl-2 در سلول‌های تکا: همان‌طور که در **تصویر ۳**، نمودار A مشاهده می‌شود، بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر میزان بیان پروتئین Bcl-2 تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/0001$). القای ایسکمی به کاهش بسیار معنی‌دار بیان Bcl-2 در سلول‌های تکای تخمدان نسبت به گروه شم منجر شده است ($P < 0/0001$) که این کاهش می‌تواند بیانگر سرکوب قابل توجه مکانیسم‌های ضدآپوپتوزی تحت شرایط ایسکمیک باشد. در مقابل، تجویز گرلین در گروه درمان سبب افزایش معنی‌دار بیان Bcl-2 نسبت به گروه ایسکمی گردید ($P < 0/0001$) که نشان‌دهنده اثر محافظتی این پپتید در تقویت مسیرهای ضدآپوپتوزی و تعدیل آسیب ناشی از ایسکمی است. در عین حال، میزان بیان Bcl-2 در گروه دریافت‌کننده گرلین همچنان به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شم باقی ماند ($P < 0/0001$) که نشان می‌دهد گرلین اگرچه توانسته بخشی از کاهش ناشی از ایسکمی را جبران کند، اما نتوانسته سطح بیان Bcl-2 را به حد طبیعی بازگرداند.

بیان پروتئین Bcl-2 در سلول‌های گرانولوزا: **تصویر ۳**، نمودار B نشان می‌دهد بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر میزان بیان پروتئین Bcl-2 در سلول‌های گرانولوزا تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/0001$). القای ایسکمی باعث کاهش بسیار معنی‌دار بیان Bcl-2 نسبت به گروه شم شده است ($P < 0/0001$) که این کاهش می‌تواند نشان‌دهنده تضعیف مکانیسم‌های ضدآپوپتوزی در شرایط ایسکمیک باشد. تجویز گرلین در گروه درمان سبب افزایش معنی‌دار بیان Bcl-2 نسبت به گروه ایسکمی شده است ($P < 0/0001$) که بیانگر اثر محافظتی گرلین در کاهش آسیب سلولی ناشی از ایسکمی است. با این حال سطح بیان Bcl-2 در گروه درمان با گرلین همچنان به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شم باقی ماند ($P < 0/0001$) که نشان می‌دهد گرلین به‌تنهایی نتوانسته به سطح نرمال بازگردد.

در تصاویر ایمونوهیستوشیمی مربوط به بیان پروتئین Bcl-2 (**تصویر ۴**) در سلول‌های تکا و گرانولوزا، تفاوت معنی‌داری در شدت بیان پروتئین ضدآپوپتوز Bcl-2 مشاهده می‌شود؛ به‌طوری‌که گروه کنترل بیشترین شدت رنگ آمیزی را نشان می‌دهد که بیانگر سطح بالای این پروتئین و حفظ بقای سلولی است. در گروه ایسکمی، شدت رنگ آمیزی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته که نشان‌دهنده کاهش بیان Bcl-2 و افزایش احتمال فعال شدن مسیرهای آپوپتوز است. گروه درمان‌شده با گرلین بیان نسبی Bcl-2 را نسبت به گروه ایسکمی بهبود بخشیده، اما همچنان کمتر از گروه کنترل باقی مانده است. این تغییرات بیان پروتئین در سلول‌های تکا و گرانولوزا که نقش کلیدی در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی‌شده و بقای سلولی دارند، با داده‌های آماری همخوانی کامل داشته و نشان‌دهنده تأثیر محافظتی گرلین در تعدیل پاسخ سلولی به آسیب ایسکمیک است. کاهش بیان Bcl-2 در شرایط ایسکمی می‌تواند موجب افزایش آپوپتوز و اختلال در عملکرد سلول‌های تکا شود، در حالی که گرلین با تعدیل این مسیر، به حفظ سلولی کمک می‌کند.

بیان پروتئین Bcl-2 در سلول‌های جسم زرد و استروما: همان‌طور که در **تصویر ۳**، نمودارهای C و D دیده می‌شود، هیچ تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه (شم، ایسکمی و گرلین) در میزان و شدت بیان Bcl-2 در سلول‌های جسم زرد و استروما وجود نداشت ($P < 0/05$). به عبارت دیگر، ایسکمی به‌طور معنی‌داری بر میزان بیان Bcl-2 در این سلول‌ها تأثیری نگذاشت. همچنین تجویز گرلین نیز تأثیر معنی‌داری بر میزان بیان Bcl-2 در سلول‌های استروما و جسم زرد نسبت به گروه ایسکمی و شم نداشت.

بحث

پیچ‌خوردگی تخمدان به‌عنوان یک اورژانس جراحی در جنس ماده محسوب می‌شود که در اثر چرخش ساختارهای آدنکس (شامل تخمدان و / یا لوله فالوپ) حول محور رباط‌های نگه‌دارنده آن رخ می‌دهد (۲). این عارضه به اختلال در خون‌رسانی و بروز ایسکمی بافتی منجر می‌شود که در نهایت به مرگ سلولی می‌انجامد. اگرچه بازگشت جریان خون (رپر فیوژن) برای احیای بافت ایسکمیک ضروری است، مطالعات نشان می‌دهند فرایند خون‌رسانی مجدد می‌تواند آسیب بافتی را در مقایسه با ایسکمی به‌تنهایی تشدید کند (۱۴). این پدیده که به آسیب ایسکمی - رپر فیوژن معروف است، با تظاهراتی همچون ادم، خون‌ریزی، تغییر رنگ بافتی و در نهایت نکروز همراه می‌باشد (۲).

مکانیسم آسیب ایسکمی - رپر فیوژن ناشی از اختلال در متابولیسم سلولی به دنبال کاهش اکسیژن رسانی و تجمع متابولیت‌های سمی است، در حالی که خون‌رسانی مجدد برای بازگشت عملکرد بافت ضروری است، می‌تواند به تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تشدید پاسخ‌های التهابی منجر شود که نتیجه آن افزایش آسیب سلولی و مهار بازگشت بافت به عملکرد طبیعی است. جالب توجه آنکه اگرچه آسیب بافتی هم در فاز ایسکمی و هم در فاز رپر فیوژن رخ می‌دهد، سهم آسیب ناشی از خون‌رسانی مجدد اغلب نادیده گرفته می‌شود (۱۴).

در این میان، خانواده پروتئین‌های Bcl-2 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی آپوپتوز شناخته می‌شوند. تعادل بین اعضای پیش‌آپوپتوز (مانند Bax) و ضدآپوپتوز (مانند Bcl-2) نقش تعیین‌کننده‌ای در سرنوشت سلول دارد. Bcl-2 که یک پروتئین ضدآپوپتوز است و در بافت‌های مختلف، از جمله سیستم ایمنی بیان می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند سطح بیان این پروتئین در مراحل اولیه تمایز لنفوسیتی پایین است و با بلوغ سلول‌های B و T افزایش می‌یابد که این افزایش با مقاومت بیشتر سلول‌ها در برابر آپوپتوز همراه است (۹، ۱۰). در مقابل، Bax به‌عنوان یک پروتئین پیش‌آپوپتوز با خنثی کردن اثرات Bcl-2، مسیرهای مرگ سلولی را فعال می‌کند (۱۰). نسبت Bax به Bcl-2 عامل تعیین‌کننده‌ای در پاسخ سلول به محرک‌های آپوپتوزی است؛ به طوری که غلبه Bax به مرگ سلولی منجر می‌شود، در حالی که غلبه Bcl-2 از آپوپتوز جلوگیری می‌کند.

گرلین، یک پپتید ۲۸ اسیدآمینو است که به‌عنوان لیگاند اندوژن گیرنده هورمون رشد عمل می‌کند. این هورمون عمدتاً در معده و هیپوتالاموس تولید می‌شود و در تحریک ترشح هورمون رشد و تنظیم اشتها نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۵). اگرچه بیان ژن گرلین در بافت‌های مختلفی، از جمله معده، روده کوچک و مغز گزارش شده است، بالاترین سطح آن در معده مشاهده می‌شود (۱۶). در تخمدان، گرلین و گیرنده‌های آن در سلول‌های بینابینی، لوتئال، اووسیت و فولیکول‌ها شناسایی شده‌اند که نشان‌دهنده نقش احتمالی این هورمون در تنظیم عملکرد فولیکولی و لوتئال است (۱۷، ۱۸). مطالعات بر روی موش‌های صحرایی نیز بیان مداوم گرلین را در طول چرخه استروس تأیید کرده‌اند، به طوری که کمترین سطح بیان در فاز پروستروس و بیشترین آن در دیاستروس مشاهده شده است (۷).

گرلین با تعدیل مسیرهای انتقال پیام (Signaling)، نقش مهمی در کاهش آپوپتوز سلول‌های تخمدانی ایفا می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند گرلین با افزایش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک مانند Bcl-2 و کاهش فعالیت کاسپاز-۳ (آنزیم اجرایی آپوپتوز)، بقای سلول‌های گرانولوزا و لوتئال را تقویت می‌کند (۱۹). همچنین گرلین از طریق فعال‌سازی مسیرهای پیغامبر ثانویه مانند ERK1/2، تکثیر سلولی را تحریک و مرگ برنامه‌ریزی‌شده را مهار می‌کند (۲۰). در مدل‌های حیوانی، افزایش هم‌زمان گرلین و استرادیول در فولیکول‌های تخمدانی طی بارداری، با افزایش بیان PCNA (شاخص تکثیر سلولی) و کاهش نشانگرهای آپوپتوتیک همراه است که نشان‌دهنده تعامل این هورمون با فاکتورهای استروئیدی در تنظیم هموستاز تخمدانی است (۱۹). علاوه بر این، گرلین با تعدیل ترشح هورمون‌های گنادوتروپین (نظیر LH و FSH) و کاهش استرس اکسیداتیو، محیطی ضدآپوپتوز را در بافت تخمدان ایجاد می‌کند (۲۰). این مکانیسم‌ها به‌طور هماهنگ، بقای سلول‌های تخمدانی را در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک بهبود می‌بخشند.

در مطالعه حاضر، برای اولین بار تأثیر گرلین بر فعالیت‌های آپوپتوزی و غیرآپوپتوزی سلول‌های تخمدان موش صحرایی تحت شرایط پیچ‌خوردگی تجربی بررسی شد. یافته‌ها نشان داد تجویز گرلین به کاهش معنی‌دار بیان Bax و افزایش Bcl-2 در سلول‌های گرانولوزا و تکا منجر می‌شود. همچنین کاهش بیان Bax در سلول‌های جسم زرد و استروما مشاهده شد که نشان‌دهنده نقش محافظتی گرلین در کاهش التهاب و نکروز ناشی از ایسکمی - رپر فیوژن در تخمدان است. هرچند استروما عمدتاً به‌عنوان یک بافت حمایتی در تخمدان شناخته می‌شود و از سلول‌های فیبروبلاست، عروقی و ایمنی تشکیل شده است، اما نسبت به آسیب‌های ناشی از ایسکمی - رپر فیوژن حساسیت بالایی دارد. شرایط ایسکمی - رپر فیوژن به بروز استرس اکسیداتیو شدید در این سلول‌ها منجر می‌شود که می‌تواند باعث القای آپوپتوز و افزایش بیان پروتئین‌هایی مرتبط نظیر Bax گردد؛ فرایندی که بیانگر تلاش سلول‌ها برای حفظ تعادل میان بقا و مرگ برنامه‌ریزی شده است (۲۱).

این نتایج با مطالعه Kheradmand و همکاران در سال ۲۰۱۴ همسو است که نشان دادند تجویز ۱۴ روزه گرلین در موش‌های صحرایی سالم به کاهش Bax و افزایش Bcl-2 در سلول‌های تخمدان منجر می‌شود. علاوه بر این، آن‌ها گزارش کردند گرلین باعث

افزایش بیان PCNA (نشانگر تکثیر سلولی) می‌شود، در حالی که تأثیر معنی‌داری بر فعالیت کاسپاز - ۳ نداشته است (۸). نکته قابل توجه در مطالعه حاضر این است که در مقابل تجویز روزانه گرلین به مدت ۲ هفته، حتی تجویز تک‌دُز گرلین در زمان پیچ‌خوردگی و پیش از شروع ایسکمی نیز اثرات محافظتی قابل توجهی دارد.

در مقایسه با سایر مطالعات، Gencer و همکاران در سال ۲۰۱۵ تأثیر ملاتونین را بر آسیب ایسکمی - رپرفیوژن تخمدان ارزیابی کردند و کاهش قابل توجهی در تغییرات هیستوپاتولوژیک مانند احتقان عروقی، ادم و خون‌ریزی در گروه دریافت‌کننده ملاتونین مشاهده نمودند (۲۲). از سوی دیگر، Saat و همکاران در سال ۲۰۱۹ با بررسی اثر ملاتونین بر رحم موش‌های آبستن دریافتند این ترکیب می‌تواند آسیب ناشی از پیچ‌خوردگی رحم را کاهش دهد. هرچند در مطالعه آن‌ها تغییر معنی‌داری در بیان Bcl-2 و Bax مشاهده نشد (۲۳). این تفاوت ممکن است ناشی از تفاوت در ارگان هدف (رحم در مقابل تخمدان) و یا تفاوت در مارکر مورد بررسی باشد.

Abdolgaber و همکاران در سال ۲۰۲۰ نیز نشان دادند نیکوراندیل (NIC) با کاهش استرس اکسیداتیو و بیومارکرهای آپوپتوزی مانند COX-2 و CD68، اثرات محافظتی در برابر آسیب ایسکمی - رپرفیوژن تخمدان دارد (۲۴). این یافته‌ها از نظر تأثیر بر مارکرهای آپوپتوزی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. به علاوه، Gungor و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی همسپرتین گزارش کردند این ترکیب به کاهش آپوپتوز (کاهش کاسپاز-۳) و بهبود آسیب بافتی در مدل ایسکمی - رپرفیوژن تخمدان منجر می‌شود (۲۵) که مجدداً تأییدکننده نتایج این مطالعه است.

مطالعه Sayyah-Melli و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز نشان داد اریتروپویتین می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو (کاهش مالون دی‌آلدئید و افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها) در آسیب ناشی از پیچ‌خوردگی تخمدان نقش محافظتی ایفا کند (۲۶). این مکانیسم ممکن است مشابه اثر گرلین در کاهش مرگ سلولی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو باشد.

شواهد دیگر حاکی از آن است که گرلین با افزایش ترشح استرادیول (E2) از طریق فعال‌سازی آروماتاز در سلول‌های گرانولوزا، آپوپتوز در فولیکول‌های تخمدانی را مهار کرده و بقای فولیکولی را تقویت می‌کند (۲۷، ۲۸). این یافته‌ها به خوبی از نتایج مطالعه حاضر حمایت می‌کنند و نشان می‌دهند گرلین می‌تواند به عنوان یک عامل محافظتی در برابر آسیب ایسکمی - رپرفیوژن تخمدان مطرح باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: به‌طور کلی در مطالعه حاضر تغییرات سلول‌های گرانولوزا، تکا، جسم زرد و استروما و همچنین بیان Bax پایین و بیان Bcl-2 بالا، نشان‌دهنده سطح پایین آپوپتوز و بقای سلولی مناسب بود. نشانه‌های التهاب یا نکروز در بافت مشاهده نشد. همچنین در گروه ایسکمی، در بافت سلول استرومای تخمدان، تغییرات ناشی از ایسکمی مشاهده گردید. علاوه بر این، بی‌نظمی در ساختار بافت، تغییر در اندازه و شکل سلول‌ها و افزایش فضای بین سلولی دیده شد. همچنین بیان Bax افزایش و بیان Bcl-2 کاهش یافت که نشان‌دهنده افزایش آپوپتوز بود و نشانه‌هایی از التهاب یا نکروز نیز در بافت مشاهده نشد. علاوه بر این در گروه تحت درمان (گرلین)، بافت سلول استرومای تخمدان در این گروه بهبود نسبی را نشان داد. همچنین ساختار بافت نسبت به گروه ایسکمی منظم‌تر بود و سلول‌ها شکل و اندازه نزدیک‌تر به نرمال داشتند. بیان Bax کاهش و بیان Bcl-2 افزایش یافته بود، اما احتمالاً این مقادیر به‌طور کامل به سطح گروه شم نرسیدند و همین باعث شد ساختار کاملاً شبیه نرمال نباشد. علاوه بر این نشانه‌های التهاب یا نکروز در مقایسه با گروه ایسکمی کاهش پیدا کرده بود، اما همچنان به‌طور کامل برطرف نشده بود.

در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد تزریق داخل‌صفاقی گرلین قبل از ایسکمی و هم‌زمان با رپرفیوژن تخمدان پیچ‌خورده باعث کاهش قابل توجه بیان Bax و افزایش Bcl-2 در سلول‌های گرانولوزا و تکا و کاهش چشمگیر بیان Bax در سلول‌های جسم زرد و استروما می‌شود که بیان‌کننده تأثیر بسزای گرلین در کاهش مرگ سلولی ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن پیچ‌خوردگی تخمدان است.

ملاحظات اخلاقی

نحوه تزریق، جراحی و کشتار موش‌ها براساس دستورالعمل کمیته اخلاق در اخلاق در پژوهش دانشگاه لرستان به شماره LU.ECRA.2023.77 انجام شده است.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه لرستان جهت تأمین هزینه انجام این پایان نامه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Agrawal T, Teh JJ, Bobotis S, Arsenaki E, Maxwell S, Kechagias KS, et al. Torsion of tubo-ovarian complex during pregnancy: A case report. *Medicina*. 2024;60(9):1471. doi: [10.3390/medicina60091471](https://doi.org/10.3390/medicina60091471)
2. Zhu TW, Li XL. Ovarian torsion: a review of the evidence. *Obstet Gynecol Surv*. 2024;79(8):484-492. doi: [10.1097/OGX.0000000000001295](https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000001295)
3. Bridwell RE, Koyfman A, Long B. High risk and low prevalence diseases: ovarian torsion. *Am J Emerg Med*. 2022;56:145-150. doi: [10.1016/j.ajem.2022.03.046](https://doi.org/10.1016/j.ajem.2022.03.046)
4. He H. A giant ovarian cyst torsion: case report. *Medicine*. 2024;103(15):e33283. doi: [10.1097/MD.00000000000033283](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000033283)
5. Nunez-Salces M, Li H, Feinle-Bisset C, Young RL, Page AJ. The regulation of gastric ghrelin secretion. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020;230(4):e13588. doi: [10.1111/apha.13588](https://doi.org/10.1111/apha.13588)
6. Kheradmand A, Alirezaei M, Asadian P, Rafiei Alavi E, Joorabi S. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. *Andrologia*. 2009;41(6):335-340. doi: [10.1111/j.1439-0272.2009.00932.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00932.x) PMID: [19891630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19891630/)
7. Kheradmand A, Alirezaei M, Birjandi M. Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary. *Regul Pept*. 2010;162(1-3):84-89. doi: [10.1016/j.regpep.2010.02.008](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.02.008) PMID: [20171996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20171996/)
8. Kheradmand A, Dezfoulan O, Alirezaei M. Ghrelin is a regulator of cellular apoptosis and proliferation in the rat ovary. *Int J Pept Res Ther*. 2014;20(3):289-298. doi: [10.1007/s10989-014-9394-z](https://doi.org/10.1007/s10989-014-9394-z) PMID: [22360851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22360851/)
9. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):65-80. doi: [10.1038/cdd.2017.186](https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186) PMID: [29149100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29149100/)
10. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*. 2011;21(1):92-101. doi: [10.1016/j.devcel.2011.06.017](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.017)
11. Valentini E, Martile M, Brignone M, Caprio M, Manni I, Chiappa M, et al. Bcl-2 family inhibitors sensitize human cancer models to chemotherapy: role in ovarian cancer chemoresistance. *Cell Death Dis*. 2023;14:441. doi: [10.1038/s41419-023-05963-1](https://doi.org/10.1038/s41419-023-05963-1)
12. Ahmed A, Bakheet R, Abdelmohsen W, Mohammed M, Adly M. Balance of glandular and stromal Bcl2/Bax expression in pre-neoplastic and neoplastic endometrial tissues. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2020;41(2):265-272. doi: [10.31083/j.ejgo.2020.02.5273](https://doi.org/10.31083/j.ejgo.2020.02.5273)
13. Kheradmand A, Alirezaei M, Dezfoulan O. Biochemical and histopathological evaluations of ghrelin effects following cadmium toxicity in the rat testis. *Andrologia*. 2015;47(6):634-643. doi: [10.1111/and.12311](https://doi.org/10.1111/and.12311)

14. Afolabi O, Hamed M, Anyogu D, Adeyemi D, Odetayo A, Akhigbe R. Atorvastatin-mediated downregulation of VCAM-1 and XO/UA/caspase 3 signaling averts oxidative damage and apoptosis induced by ovarian ischaemia/reperfusion injury. *Redox Rep.* 2022;27(1):212-220. doi: [10.1080/13510002.2022.2129192](https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2129192) PMID: [36200598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36200598/)
15. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 2005;85(2):495-522. doi: [10.1152/physrev.00012.2004](https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2004) PMID: [15788704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15788704/)
16. Delhanty PJ, van der Eerden BCJ, van Leeuwen JPTM. Ghrelin and bone: clinical and experimental evidence. *Biofactors.* 2014;40(1):41-48. doi: [10.1002/biof.1120](https://doi.org/10.1002/biof.1120)
17. Caminos J, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado J, Barreiro M, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology.* 2003;144(4):1594-1602. doi: [10.1210/en.2002-221058](https://doi.org/10.1210/en.2002-221058) PMID: [12639944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12639944/)
18. Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Alwasel S, Harrath AH. Ghrelin and obestatin can promote human ovarian granulosa cell functions and FSH effects. *Reprod Biol.* 2023;23(3):100795. doi: [10.1016/j.repbio.2023.100795](https://doi.org/10.1016/j.repbio.2023.100795) PMID: [37586298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37586298/)
19. Alirezai M, Dezfoulian O, Abasi M, Sookhtehzari A. Ghrelin role in apoptosis and proliferation of ovine ovarian follicles and corpus luteum. *Small Rumin Res.* 2017;157:1-7. doi: [10.1016/j.smallrumres.2017.10.003](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.10.003)
20. Pan D, Wang K, Cao G, Fan K, Liu H, Li P, et al. Inhibitory effect of central ghrelin on steroid synthesis affecting reproductive health in female mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;204:105750. doi: [10.1016/j.jsbmb.2020.105750](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105750) PMID: [32920127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32920127/)
21. Rashad NM, Saraya YS, Afifi SA, Ali AE, Al-sayed RM. Impact of weight loss on plasma ghrelin level, clinical, and metabolic features of obese women with or without polycystic ovary syndrome. *Middle East Fertil Soc J.* 2020;24:12. doi: [10.1186/s43043-019-0006-x](https://doi.org/10.1186/s43043-019-0006-x)
22. Gencer M, Karaca T, Güngör AN, Hacivelioglu ŞÖ, Demirtaş S, Turkon H, et al. The protective effect of quercetin on IMA levels and apoptosis in experimental ovarian ischemia-reperfusion injury. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;177(1):135-140. doi: [10.1016/j.ejogrb.2014.03.036](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.03.036) PMID: [24793929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24793929/)
23. Saat N, Risvanli A, Dogan H, Onalan E, Akpolat N, Seker I, et al. Effect of melatonin on torsion and reperfusion induced pathogenesis of rat uterus. *Biotechnic Histochem.* 2019;94(7):533-539. doi: [10.1080/10520295.2019.1605456](https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1605456) PMID: [31070494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31070494/)
24. Abdel-Gaber SA-W, Atta M, Abdel-Hafez SMN, Abdelzaher WY. Ameliorative effect of nicorandil in ovarian ischemia-reperfusion-induced injury in rats: role of potassium channel. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393:1599-1610. doi: [10.1007/s00210-020-01854-w](https://doi.org/10.1007/s00210-020-01854-w) PMID: [32266443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32266443/)
25. Cakir Gungor AN, Gencer M, Karaca T, Hacivelioglu S, Uysal A, Korkmaz F, et al. The effect of hesperetin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;290:763-769. doi: [10.1007/s00404-014-3267-8](https://doi.org/10.1007/s00404-014-3267-8) PMID: [24806622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24806622/)
26. Sayyah-Melli M, Rashidi MR, Kaseb-Ganeh M, Rashtchizadeh N, Taghavi S, Ouladsahebmadarek E, et al. The effect of erythropoietin against oxidative damage associated with reperfusion following ovarian detorsion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;162(2):182-186. doi: [10.1016/j.ejogrb.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.02.014)
27. Dong S, Jiang S, Hou B, Li Y, Sun B, Guo Y, et al. miR-128-3p regulates follicular granulosa cell proliferation and apoptosis by targeting the growth hormone secretagogue receptor. *Int J Mol Sci.* 2024;25(5):2720. doi: [10.3390/ijms25052720](https://doi.org/10.3390/ijms25052720) PMID: [38473968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38473968/)
28. Urzúa U, Marín A, Castellón EA. Oxidative stress, parity history, and remnant follicles in the aged ovary: insights on ovarian cancer risk and protection. *Antioxidants.* 2025;14(7):759. doi: [10.3390/antiox14070759](https://doi.org/10.3390/antiox14070759)