بررسی الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌ها و محافظت از استرس اکسیداتیو مایع فولیکولی زنان سالم و نازا

مریم حسن‌پور[۱]، دکتر محمد تقی گودرزی[۲*]، دکتر مهناز نوری[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران.
۲. استاد گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران.
۳. استادیار گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۹/۰۶

خلاصه

مقدمه: مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که ۱۵-۱۰٪ از زوجین در دنیا ناباروری را تجربه می‌کنند. برآورد می‌شود که تقریباً ۵۰-۴۰٪ از مشکلات نازایی منشأ زنانه و ۳۰٪ موارد منشأ مردانه دارند و بقیه مربوط به هر دو نفر می‌باشد. مایع فولیکولی، محیطی را برای توسعه تخمک‌گذاری ایجاد می‌کند و منعکس‌کننده فعالیت‌های بیوشیمیایی و هورمونی فولیکول‌ها در اندازه‌های متفاوت می‌باشد. تأثیر استرس اکسیداتیو مایع فولیکول بر بلوغ تخمک، بارور شدن و بارداری به‌طور کامل مشخص نیست، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در زنان سالم و نازا و همچنین بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های مایع فولیکی در این دو گروه انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد- شاهدی و مقطعی در سال ۱۳۹۷ بر روی ۱۷ زن نازا با اختلال تخمک‌گذاری و ۱۷ زن سالم با نازایی به دلیل اختلال مردانه کاندید IVF مراجعه کننده به مرکز ناباروری فاطمه الزهراء بابل انجام شد. نمونه-های مایع فولیکولی از ۳۴ زن نازا و سالم استخراج گردید. خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های FRAP (بررسی توان آنتی‌اکسیدانی به روش احیای فریک) و DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) سنجش شد و میزان پراکسیداسیون لیپیدی با سنجش مالون دی آلدئید (MDA) تعیین شد. جهت بررسی الگوی الکتروفورز پروتئین‌ها از الکتروفورز عمودی SDS PAGE (الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید در حضور سدیم‌دو- دسیل سولفات) و جهت سنجش پروتئین توتال از روش برادفورد استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون تی انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، خاصیت آنتی‌اکسیدانی (p=۰/۲۳) و پراکسیداسیون لیپیدی (p=۰/۴۵) در دو گروه اختلاف معناداری را نشان نداد. همچنین نتایج تست الکتروفورز و پروتئین توتال نیز در دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت (p=۰/۷۳). بیشترین میزان پروتئین‌ها در هر دو گروه در باند ۷۵-۴۸ کیلو دالتون مشاهد شد.

نتیجه‌گیری: اگرچه بین دو گروه مورد مطالعه در شاخص‌های استرس اکسیداتیو اختلاف وجود داشت، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود که دلیل آن را می‌توان به کم بودن تعداد نمونه در هر گروه نسبت داد. جهت نشان دادن اختلاف در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های مایع فولیکولی نیاز به بررسی دقیق‌تر با استفاده از الکتروفورز دوبُعدی وجود دارد.

کلمات کلیدی: استرس اکسیداتیو، الکتروفورز پروتئین، مایع فولیکولی، ناباروری زنان

* **نویسنده مسئول مکاتبات**: دکتر محمد تقی گودرزی؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران. **تلفن**: ۰۲۳-۳۲۳۹۰۳۶۰؛ **پست الکترونیک**: : mtgoodarzi@yahoo.com

مقدمه

عوامل متعددی با کاهش باروری در ارتباط هستند. ۶ فاکتور خطر بر اساس ارتباط آنها برای یک جمعیت جوان معرفی شده است که شامل سن، وزن، سیگار کشیدن (تنباکو و ماری‌جوانا)، مصرف الکل، استرس و STIها[1] (به عنوان مثال کلامیدیا) می‌باشند (۱، ۲). اهمیت اتیولوژیکی عوامل محیطی در ناباروری بسیار تأکید شده است. توکسین‌هایی مانند چسب، حلال‌های آلی فرار یا سیلیکون‌ها، عوامل فیزیکی، گردوغبار شیمیایی و آفت‌کش‌ها نیز در ناباروری دخیل هستند (۳). بررسی مایع فولیکولی در سال‌های اخیر افزایش یافته است، اما متابولیسم آن متأسفانه هنوز نسبتاً ناشناخته است. چندین متابولیت با استفاده از کیت‌های تجاری یا تکنیک‌های کروماتوگرافی شناسایی شده‌اند. به‌عنوان مثال، ترکیب آمینواسید مایع فولیکولی انسان و برخی از حیوانات شناسایی شده‌اند. ترکیب یونی، حضور گلوکز، لاکتات، اوره و سایر متابولیت‌ها و لیپیدها نیز تعیین شده است.

مایع فولیکولی در طی فولیکولوژنز تولید می‌شود و شامل انواع پروتئین‌هایی است که نقش مهمی در رشد فولیکول‌ها و بلوغ تخمک دارند. این مایع بیولوژیک شامل بیش از ۲۰۰ پروتئین مختلف است که منعکس‌کننده مرحله توسعه تخمک‌گذاری و درجه بلوغ فولیکول است. برخی مطالعات حضور پروتئین‌های مختلف را در مایع فولیکولی گزارش کرده‌اند. تغییرات کیفی و کمّی در ترکیبات مایع فولیکولی می‌تواند بر کیفیت تخمک تأثیر بگذارد و از این‌رو به‌طور بالقوه بر باروری تأثیرگذار می‌باشد. این تغییرات در مایع فولیکولی می‌تواند به علت تغییرات متابولیک در سرم باشد (۴). علاوه بر این، سلول‌های گرانولوزا می‌توانند نقش مهمی در تغییر مایع فولیکولی به‌وسیله فیلتر کردن انتخابی و شاید تبدیل برخی متابولیت‌ها داشته باشند. علاقه فراوان به تعیین اینکه آیا ترکیب متابولیکی مایع فولیکولی می‌تواند اطلاعاتی در مورد کیفیت تخمک و زندگی جنین و یا حتی در مورد توسعه بیماری‌های ممکن در بزرگسالان ارائه دهد، در حال افزایش می‌باشد (۵).

[1] Sexually transmitted infections

مطالعات متعددی حضور گنادوتروپین‌ها و استروئیدها در مایع فولیکولی را به‌عنوان نشانگرهای بلوغ تخمک نشان می‌دهند. عوامل دیگری همچون فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)[2]، مهار کننده‌های A و B، هورمون آنتی‌مولرین (AMH)[3]، لکتوفرین، فاکتور رشد شبه انسولین II (IGF-II)[4]، هیالورونان، اکسید نیتریک، لپتین، OH-۲۵ ویتامین D، گلوکز، پروتئین‌های شکل‌دهنده استخوان (BMPs)[5] و اینترلوکین ۸، با بلوغ تخمک و فولیکولوژنز ارتباط دارند. اولین تلاش برای تشخیص پروتئین‌های مایع فولیکولی منجر به تشخیص پروتئین‌های جدیدی شد که از جمله می‌توان تیوردوکسین پراکسیداز ۱ (TDPX1)[6]، ترانس تیرتین (TTR)[7]، پروتئین متصل‌شونده به رتینول (RBP)[8]، لیپاز حساس به هورمون (HSL)[9]، اوریدین فسفوریلاز ۱ (UPP1)[10]، اوریدین فسفوریلاز ۲ (UPP2)[11] و پیش‌ساز آپولیپوپروتئین A-IV (ApoA4)[12] را نام برد (۶).

مایع فولیکولی، علاوه بر سلول‌های گرانولوزا، سیتوکین‌ها و ماکروفاژها، انواع گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS)[13] را تولید می‌کند که باعث آسیب پراکسیداسیون می‌شوند (۷). مطالعات اخیر در مورد پاتوفیزیولوژی ناباروری زن و مرد نشان داده است که استرس اکسیداتیو ممکن است یکی از عوامل ایجاد کننده ناباروری زنان باشد. در حال حاضر استرس اکسیداتیو به عنوان افزایش‌دهنده سطح گونه‌های واکنشگر اکسیژن به‌دلیل کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها برای تمیز کردن (زباله‌روبی) و حذف این رادیکال‌های آزاد تعریف شده است (۸، ۹).

استرس اکسیداتیو به عدم تعادل بین تولید و خنثی‌سازی گونه‌های واکنشگر اکسیژن تعریف می‌شود که ممکن است به علت تولید ROS بیش از حد رخ

[2] Vascular endothelial growth factor
[3] Anti-Müllerian hormone
[4] Insulin-like growth factor 2
[5] Bone morphogenetic proteins
[6] Thioredoxin peroxidase-1
[7] Transthyretin
[8] Retinol Binding Protein
[9] Hormone-sensitive lipase
[10] uridine phosphorylase 1
[11] uridine phosphorylase 2
[12] Apolipoprotein A-IV precursor
[13] reactive oxygen species

دهد (۱۰). ROS ممکن است به افزایش استرس اکسیداتیو، ایجاد پراکسیداسیون لیپیدها و محصولات تخریب آن و محصولات تولید شده توسط تعامل آنها با لیپوپروتئین‌های با چگالی کم و دیگر پروتئین‌ها کمک کند. لیپیدهای پراکسید شده هنگامی که تحت تجزیه قرار می‌گیرند، ممکن است محصولاتی مانند مالون دی آلدئید (MDA)[1] تولید کنند و ممکن است به‌عنوان جسم خارجی شناخته شوند و یک واکنش آنتی‌ژنیک را با تولید آنتی‌بادی تولید کنند. بنابراین، افزایش سطوح استرس اکسیداتیو در مایع فولیکولی باعث کاهش توانایی لقاح و رشد جنین می شود (۱۱، ۱۲).

هدف اصلی ROS چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها هستند. واکنش‌های اکسیداتیو می‌تواند به‌طور کامل خواص فیزیکی/شیمیایی پروتئین‌ها را توسط پروتئولیز، تغییرات ساختاری و اکسیداسیون زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها تغییر دهد (۱۳). در حقیقت، اکسیداسیون گروه R از اسیدهای آمینه موجب تغییرات نقطه ایزوالکتریک می‌شود، در حالی‌که تشکیل پیوندهای داخل مولکولی و/یا شکافتن پروتئین به قطعات پپتید باعث تغییر وزن مولکولی می‌شود (۱۴). علاوه بر این، پروتئین‌هایی که در ساختار خود دارای سیستئین و متیونین هستند، بیشتر به حمله ROS حساس هستند، از آنجا که تیول‌ها ممکن است تحت اکسیداسیون برگشت‌پذیر قرار گیرند (۱۵، ۱۶).

در شرایط عادی مولکول‌های پاک کننده شناخته شده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها از تولید بیش از حد این محصولات سمی جلوگیری می‌کنند. هنگامی که تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها به سمت فراوانی رادیکال‌های آزاد سرازیر می‌شود، استرس اکسیداتیو (OxS)[2] رخ می‌دهد که باعث آسیب مولکولی به ساختار ساختار و عملکرد حیاتی بیومولکول‌ها می‌شود (۱۷). فرض شده است که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در طی فولیکولوژنز (بلوغ فولیکول تخمدان) افزایش می‌یابد، زیرا توانایی رشد با افزایش اندازه فولیکول افزایش می‌یابد (۱۸، ۱۹). در عین حال، مایع فولیکول دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی است که شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[3]، گلوتاتیون پراکسیداز وابسته به سلنیوم (SeGPx)[4]، کاتالاز (CAT)[5]، تیوردوکسین و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)[6] و ویتامین‌های A، C، E و تورین می‌باشد که به احتمال زیاد برای مقابله با اثرات بالقوه مضر ROS کار می‌کنند (۲۰، ۲۱). میزان فعالیت شاخص آنتی‌اکسیدانی در مایع فولیکولی زنان نابارور نسبت به زنان بارور پایین‌تر بوده و سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در مایع فولیکولی فولیکول‌های حاوی اووسیت نسبت به فولیکول‌های بدون اووسیت کمتر می‌باشد. افزایش میزان استرس اکسایشی مایع فولیکولی با تخریب DNA موجب افزایش آپوپتوزیس می‌شود (۱۱، ۲۲). هانگ و همکاران (۲۰۱۴) طی مطالعه‌ای بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در بیماران تحت لقاح آزمایشگاهی (IVF)[7] در گروه‌های مختلف دریافتند دریافتند که مایع فولیکولی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که معادل آنتی‌اکسیدان‌های معمول مانند ویتامین C است. اگرچه تفاوت معناداری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در بیماران مبتلا به پیامدهای مختلف بارداری نداشتند، اما تمایل به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مایع فولیکولی در افراد با حاملگی مثبت نسبت به گروه منفی مشاهده شد (۲۳). ال شهات و همکاران (۲۰۱۲) که به بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در رابطه با اندازه فولیکول و مرحله از چرخه استروس[8] (دوره پذیرش: مدت زمانی است که در آن پستاندار ماده آماده باروری است) و تولید هورمون‌های تولید مثلی گاومیش‌ها پرداختند، تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها همچون گلوتاتیون (GSH)[9]، گلوتاتیون گلوتاتیون ردوکتاز (GR)[10]، SOD و CAT را بررسی کردند. آنها همچنین میزان MDA را به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی اندازه‌گیری نمودند و دریافتند که غلظت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی به‌جز کاتالاز، با توجه به

[1] Malondialdehyde
[2] Oxidative stress

[3] Superoxide dismutase
[4] Selenium dependent glutathione peroxidase
[5] Catalase
[6] Glutathione peroxidase
[7] In vitro fertilisation
[8] Estrous cycle
[9] Reduced Glutathione
[10] Glutathione reductase

اندازه فولیکول و مرحله چرخه استروسی متفاوت است، که نشان‌دهنده نقش احتمالی آنها در روند رشد فولیکولار در طی چرخه استروس در بوفالوها است (۲۴). میجیده و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای بر روی نقش بلوغ فولیکولی در فعالیت‌های پاراکسوناز (PON)[1] در مایع فولیکول‌های انسانی دریافتند که فعالیت PONها در طول بلوغ فولیکول ممکن است افزایش یابد و فعالیت PON در ارتباط با تعداد کل تخمک‌ها می‌باشد. همچنین آنها نشان دادند که فعالیت‌های PONها در فولیکول‌های بزرگ در مقایسه با آنهایی که کوچک‌اند، در زنان بارور نسبت به زنان نابارور تحت یک چرخه تحریک تخمدان افزایش یافته است (۲۵). همچنین در مطالعه خسروبیگی و همکار (۲۰۱۷) علی‌رغم کاهش گلوتاتیون در بیماران مبتلا به دیابت بارداری، تغییر معنی‌داری در PON مشاهده نکردند (۲۶). نصیری و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای بر روی وضعیت استرس اکسیداتیو در سرم و مایع فولیکولی زنان مبتلا به اندومتریوز، دارای سطوح بالاتری از لیپید پراکسیداز (LPO)[2] و سطوح پایین‌تری از TAC[3] در سرم و مایع مایع فولیکولی نسبت به گروه شاهد بودند که در نتیجه مایع فولیکولی زنان مبتلا به آندومتریوز موجب افزایش قدرت تکثیر سلول‌های آندومتر در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۲۷). دوویاک و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای بر روی مقایسه سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سیال فولیکولی در بیماران تحت درمان با تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[4] دریافتند که میزان رشد جنین با افزایش سن کاهش می‌یابد. در یائسگی زودرس، سطوح SOD افزایش می‌یابد، در حالی که سطوح کاتالاز کم می‌شود (۲۸). الیزور و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای بر روی گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS)[5] در مایع فولیکولی که ممکن است به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی برای تعیین پیری تخمدان و سن متابولیک فولیکول‌ها باشند، نقش استرس اکسیداتیو را در روند پیری تخمدان با اندازه‌گیری H_2O_2 بررسی نمودند. آنها بالاترین سطح H_2O_2 را در فولیکول‌ها که جنین‌های با کیفیت پایین داشتند و پایین‌ترین سطح H_2O_2 را در فولیکول‌های خالی مشاهده کردند. این مشاهدات نشان می‌دهد که روند پیری تخمدان، کاهش میزان فولیکول‌ها و کاهش کیفیت تخمک، ممکن است با افزایش تدریجی در سطح ROS فولیکولی همراه باشد که ممکن است از هر دو افزایش تولید ROS و یا کاهش در تخریب ROS حاصل گردد (۲۹). لودی و همکاران (۲۰۱۶) میزان آنتی‌اکسیدان‌ها را با کاهش استرس اکسیداتیو در مایع فولیکولی زنان سالمند تحت درمان IVF بررسی کردند. در این مطالعه سرم و مایع فولیکولی زنان نابارور بالای ۳۹ سال که ۲ بار تحت لقاح آزمایشگاهی قرار گرفتند، جمع‌آوری گردید و تست‌های الکتروفورز برای سطوح اکسیداسیون پروتئین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در سرم و مایع فولیکولی در دوره‌های IVF با یا بدون مکمل‌های مغذی مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل الکتروفورز دوبُعدی و تست بررسی توان آنتی اکسیدانی به روش احیای فریک FRAP[6] نشان داد که وقتی بیماران قبل از سیکل IVF میکرومغذی را مصرف کردند، مایع فولیکول و پروتئین سرم از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌شود (۱۴). کاظمی و همکاران (۲۰۱۵) ارتباط بین مصرف ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی رژیم غذایی و استرس اکسیداتیو در مایع فولیکولی و نتایج تکنیک‌های کمک باروری (ART) را بررسی نمودند. پس از مصرف ویتامین‌های A، C و E توسط زنان تحت ART، میزان مالون دی آلدئید و TAC آنها اندازه‌گیری شد. آنها دریافتند که ارتباط معنی‌داری بین میزان مصرف ویتامین‌ها و بیومارکرهای استرس اکسیداتیو وجود ندارد، اما مصرف بالای ویتامین C در رژیم غذایی با افزایش سطح TAC در مایع فولیکولی و بهبود کفایت اووسیت همراه خواهد بود (۳۰). مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در زنان سالم و نازا و همچنین بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های مایع فولیکی در این دو گروه انجام شد.

[1] Paraoxonases
[2] lipid peroxidase
[3] Total Antioxidant Capacity
[4] Intracytoplasmic sperm injection
[5] Reactive oxygen species
[6] Ferric reducing antioxidant power

روش‌کار

این مطالعه مورد- شاهدی و مقطعی در سال ۱۳۹۷ بر روی ۱۷ زن نازا با اختلال تخمک‌گذاری و ۱۷ زن سالم با سابقه نازایی به دلیل اختلال مردانه کاندید IVF انجام شد. زوجینی که ناباروری را تجربه کرده و به این علت به مراکز درمان ناباروری فاطمه الزهراء بابل مراجعه کردند، به دو دسته تقسیم شدند؛ دسته‌ای فقط به‌دلیل اختلال ناباروری مردانه و عده‌ای دیگر به دلیل اختلالات زنانه مراجعه کردند. در این مطالعه زنان مراجعه کننده به‌دلیل اختلال مردانه به عنوان گروه کنترل و زنان مراجعه کننده با اختلال زنانه به عنوان گروه بیمار (مورد) انتخاب شدند. در بین گروه بیمار، کسانی که بر اساس تشخیص پزشک، با تشخیص اختلال در تخمک‌گذاری پذیرش شدند، وارد مطالعه و در صورت ابتلاء به سایر اختلالات از مطالعه خارج شدند؛ بدین‌منظور در بدو ورود زوجین به مراکز ناباروری از طریق مصاحبه، اطلاعات لازم گرفته شد و در پرسشنامه ثبت گردید و سپس از این اطلاعات برای آنالیز استفاده شد. دو گروه از نظر سن (۳/۷±)، ناباروری اولیه یا ثانویه و سابقه IVF همسان‌سازی شدند. حجم نمونه بر اساس فرمول محاسبه حجم نمونه در اینگونه مطالعات و نتایج مشابه در مقاله منتشر شده (۲۷) و با در نظر گرفتن α=۰/۰۵، β=۰/۱، $Z_{1-\alpha/2}$=۱/۹۶ و $Z_{1-\beta/2}$=۱/۲۸، ۱۶ نفر در هر گروه محاسبه شد. در مطالعه حاضر ۱۶ نمونه از زنان نابارور که توسط پزشک متخصص زنان و زایمان تشخیص داده شدند و ۱۶ نمونه از گروه کنترل (افراد سالم) انتخاب شدند. نمونه‌های مایع فولیکولی توسط پزشک متخصص استخراج شد. تمامی مراحل آزمایش با رضایت آگاهانه زوجین انجام گردید و رضایت‌نامه کتبی اخذ شد. پروتکل مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد تصویب شد. بیمارانی که با تشخیص آندومتریوز و اختلالات لوله‌ای بودند، از مطالعه حذف شدند.

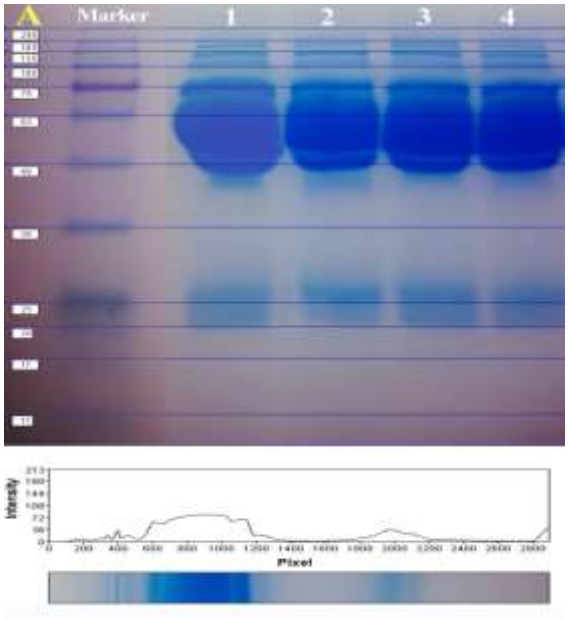
نمونه‌ها پس از انجام پانکچر، در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس ۶ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و در فریز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری MDA مورد استفاده قرار گرفتند. مالون دی آلدهید به عنوان مارکری برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی مطرح است که به روش تشریح شده توسط اوهکاوا و همکاران (۱۹۷۹) (۳۱) انجام شد.

پروتئین تام توسط کیت اندازه‌گیری پروتئین Nadford™ اندازه‌گیری شد. سنجش پروتئین به روش برادفورد، یک روش رنگ‌سنجی سریع، ساده، دقیق و حساس است که برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین در نمونه‌های بیولوژیکی به‌کار می‌رود. اساس روش برادفورد بر تشکیل کمپلکس بین رنگ آبی کوماسی G-250 و پروتئین‌های موجود در محلول استوار است.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)[1] و FRAP انجام شد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که محلول متانولی آن دارای رنگ بنفش است، ولی با گرفتن یک الکترون از مواد آنتی‌اکسیدان به DPPH تبدیل می‌شود که زردرنگ است و در ۵۱۷ نانومتر جذب ندارد. به‌منظور اندازه‌گیری توانایی مهار رادیکال‌های آزاد[2] از خاصیت رنگ‌زدایی آنتی‌اکسیدان‌ها در حضور DPPH استفاده می‌شود؛ بدین‌منظور ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع فولیکولی نمونه‌های مختلف با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه دور از نور و در دمای اتاق، جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. روش آزمون FRAP روش ساده‌ای است که نتایج سریع و تکرارپذیری را ایجاد می‌کند. در این روش، توانایی آنتی‌اکسیدان در احیاء آهن مورد سنجش قرار می‌گیرد. نتایج عموماً به‌صورت معادل میکرومولار آهن II در میلی‌لیتر نمونه بیان می‌شود. در این آزمون از معرف FRAP استفاده می‌شود که مخلوطی از کلرید آهن و تری پیریدیل- تریازین (TPTZ)[3] است که موجب احیاء آهن سه ظرفیتی شده و تشکیل کمپلکس آبی‌رنگ با آهن دو ظرفیتی می‌دهد که در طول موج ۵۹۳ نانومتر حداکثر جذب را دارد. به‌منظور بررسی و جداسازی پروتئین‌ها، از تکنیک الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دو-دسیل سولفات (SDS-PAGE)[4] استفاده

[1] 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
[2] Free Radical Scavenging Activity
[3] tripyridyltriazine
[4] sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

گردید. در این تکنیک مولکول‌های پروتئینی با استفاده از سدیم دودسیل سولفات به‌صورت خطی در می‌آیند و حرکت آنها بر اساس وزن مولکولی می‌باشد. مسافت طی شده پروتئین‌ها با لگاریتم وزن مولکولی آنها رابطه خطی دارد. پس هرچه پروتئین بزرگ‌تر باشد، مسافت طی شده کمتر است. با مقایسه نمودن میزان حرکت پروتئین مورد نظر بر روی ژل با مارکر پروتئینی با استفاده از رسم خط تراز حرکت نسبی می‌توان وزن مولکول هدف را تخمین زد (شکل ۱).



شکل ۱- تصویری از الکتروفورز زوی ژل پلی‌آکریلامید مربوط به نمونه‌های مایع فولیکولی پس از رنگ‌آمیزی (A). ستون اول از سمت چپ مربوط به مارکر پروتئینی است که دارای دامنه وزنی ۲۴۵-۱۰ کیلودالتون می‌باشد. ردیف‌های ۱ و ۲ مربوط به دو نمونه بیمار و ردیف‌های ۳ و ۴ مربوط به نمونه‌های کنترل می‌باشند. ژل‌ها با استفاده از نرم‌افزار ژل آنالایزر مطالعه و سطح زیر منحنی آنها محاسبه شد. شکل (B) تصویری از نمودار ترسیم شده برای یک نمونه می‌باشد.

ژل پلی‌اکریل آمید، نقش بسیار مؤثری در تفکیک پروتئین‌ها در SDS-PAGE دارا می‌باشد. قطر منافذ موجود در ژل پلی‌اکریل آمید که متأثر از غلظت دو جزء سازنده آن می‌باشد (اکریل‌آمید و بیس‌اکریل آمید) و غلظت هر یک در محلول، دامنه وزنی قابل تفکیک در SDS-PAGE را مشخص می‌کند. برای اینکه باندها قابلیت تفکیک مناسب داشته باشند، در زمان راه‌اندازی کار، چندین دامنه غلظتی ($\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{2}, \frac{1}{16}, \frac{1}{12}, \frac{1}{8}, \frac{1}{4},$) جهت الکتروفورز استفاده شد. بر اساس باندهای به‌دست آمده، رقت $\frac{1}{16}$ از سایر رقت‌ها بهتر جواب داد.

برای انجام تست‌ها از رقت $\frac{1}{16}$ استفاده شد. ۳ میکرولیتر از بافر نمونه[1] به ۱۰ میکرولیتر نمونه رقیق شده افزوده شد. برای مارکر پروتئینی[2] نیز طبق پروتکل شرکت (شرکت سیناکلون)، ۳ میکرولیتر محلول بافر نمونه به ۵-۳ میکرولیتر مارکر افزوده شد. سپس یک‌بار همه نمونه‌ها اسپین شدند و به‌مدت ۵ دقیقه در دستگاه هات‌پلیت[3] با درجه حرارت ۹۵ درجه گذاشته شد. در این شرایط پروتئین‌ها به واسطه اثر SDS[4] و ماده احیاء کننده ۲- مرکاپتو اتانول (2ME)[5] کاملاً دناتوره شدند. میزان SDS در بافر نمونه بارها بیشتر از میزان پروتئین می‌باشد (میزان ۳ به ۱) تا کاملاً از اشباع شدن پروتئین با SDS اطمینان حاصل شود. الکتروفورز در دو مرحله و ابتدا در ولتاژ ۱۲۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه و سپس در

[1] Loading Buffer

[2] Protein Ladder
[3] Hot plate
[4] Sodium dodecyl sulfate
[5] β-Mercaptoethanol

ولتاژ۱۶۰ به‌مدت ۱۰۰ دقیقه انجام شد. پس از آن با استفاده از رنگ کوماسی بلو R-250 رنگ‌آمیزی و سپس با استفاده از محلول رنگ‌بری حاوی متانول، اسید استیک و آب، رنگ‌زدایی و شفاف گردید. باندهای به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Gel Analyzer آنالیز گردید.

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد که پس از تأیید توزیع نرمال یافته‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون تی انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در جدول ۱ میانگین متغیرهای دموگرافیک با یکدیگر مقایسه شده است. بر اساس نتایج، بین دو گروه از نظر متغیرهای دموگرافیک شامل: سابقه فامیلی مرد ($p=۰/۰۳$)، تشخیص پزشک ($p<۰/۰۰۱$)، الگوی قاعدگی ($p=۰/۰۱$) و PCOS ($p<۰/۰۰۱$) اختلاف معناداری وجود داشت و در دیگر متغیرها هرچند اختلاف وجود داشت، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$).

جدول۱- مقایسه متغیرهای دموگرافیک در دو گروه بیمار و سالم

فاکتور	گروه	بیمار تعداد (درصد)	سالم تعداد (درصد)	سطح معنی داری
سابقه فامیلی زن	دارد	۷ (۴۱/۲)	۳ (۱۷/۶)	۰/۱۳
	ندارد	۱۰ (۵۸/۸)	۱۴ (۸۲/۴)	
سابقه فامیلی مرد	دارد	۳ (۱۷/۶)	۹ (۵۲/۹)	۰/۰۳
	ندارد	۱۴ (۸۲/۴)	۸ (۴۷/۱)	
بیماری زمینه‌ای	دارد	۱ (۵/۹)	۰ (۰/۰)	۰/۳
	ندارد	۱۶ (۹۴/۱)	۱۷ (۱۰۰)	
سابقه جراحی	دارد	۶ (۳۵/۳)	۱ (۵/۹)	۰/۰۳
	ندارد	۱۱ (۶۴/۷)	۱۶ (۹۴/۱)	
مصرف دارو	دارد	۳ (۱۷/۶)	۲ (۱۱/۸)	۰/۶
	ندارد	۱۴ (۸۲/۴)	۱۵ (۸۲/۲)	
مصرف OCP	دارد	۱۱ (۶۴/۷)	۹ (۶۰)	۰/۷
	ندارد	۶ (۳۵/۳)	۶ (۴۰)	
ناباروری اولیه/ثانویه	دارد	۸ (۴۷/۱)	۱۱ (۶۸/۸)	۰/۲
	ندارد	۹ (۵۲/۹)	۵ (۳۱/۳)	
مصرف سیگار	دارد	۱۳ (۷۶/۵)	۱۰ (۵۸/۸)	۰/۲
	ندارد	۴ (۲۳/۵)	۷ (۴۱/۲)	
در معرض سیگار	دارد	۱۳ (۷۶/۵)	۱۰ (۵۸/۸)	۰/۲
	ندارد	۴ (۲۳/۵)	۷ (۴۱/۲)	
الگوی قاعدگی	نرمال	۹ (۵۲/۹)	۱۷ (۱۰۰)	۰/۰۱
	نامنظم	۸ (۴۷/۱)	۰ (۰)	
سابقه سقط	دارد	۵ (۳۸/۵)	۵ (۷۱/۴)	۰/۱
	ندارد	۸ (۶۱/۵)	۲ (۲۸/۶)	
PCOS	دارد	۱۰ (۶۲/۵)	۰ (۰)	<۰۰۱
	ندارد	۶ (۳۷/۵)	۱۷ (۱۰۰)	
تشخیص پزشک	اندومتریوز	۵ (۳۳/۳)	۰ (۰)	<۰۰۱
	اختلال تخمک‌گذاری	۱۱ (۶۸/۸)	۰ (۰)	

در جدول ۲ میانگین تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی توسط تست‌های FRAP و DPPH در دو گروه سالم و بیمار مقایسه شده است. بر اساس نتایج، میانگین این دو تست در دو گروه بیمار و سالم هرچند اختلاف داشت، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۱۳، p=۰/۲۳). همچنین میانگین تغییرات میزان پروتئین تام مایع فولیکولی در دو گروه سالم و بیمار مقایسه گردید. بر اساس جدول ۲، با وجود اختلاف اندک بین پروتئین تام در دو گروه بیمار و سالم، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۳۷). تغییرات میزان پراکسیداسیون لیپیدی مایع فولیکولی نیز با استفاده از MDA در دو گروه سالم و بیمار مقایسه گردید. بر اساس نتایج با توجه به وجود اختلاف اندک بین دو گروه بیمار و سالم، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۴۵).

جدول ۲- مقایسه میانگین تغییرات سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی، پروتئین تام مایع فولیکولی و MDA در دو گروه بیمار و سالم

فاکتور / گروه	بیمار	سالم	سطح معنی‌داری
روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل DPPH (میکرومول بر لیتر)	۰/۰۷±۰/۳۸	۰/۴۲±۰/۰۷	۰/۱۳
بررسی توان آنتی اکسیدانی به روش احیای فریک FRAP (میکرومول بر لیتر)	۰/۰۵±۰/۰۷	۰/۰۴±۰/۰۹	۰/۲۳
پروتئین تام (میلی‌گرم بر میلی لیتر)	۱۶/۳۴±۶۹/۱۷	۳/۷۹±۷۲/۸۴	۰/۳۷
مالون دی آلدئید MDA (میکرومول بر لیتر)	۰/۱۶±۰/۴۲	۰/۲۴±۰/۴۷	۰/۴۵

درصد پروتئین‌های موجود در مایع فولیکولی با جرم‌های مختلف با استفاده از آنالیز سطح زیر منحنی الکتروفورزی پروتئین‌ها در دو گروه سالم و بیمار در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج، با توجه به وجود اختلاف بین دو گروه بیمار و سالم، این تفاوت برای هیچ‌کدام از باندها معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). همچنین بیشترین میزان پروتئین مایع فولیکولی در دو گروه سالم و بیمار مربوط به باند ۷۵-۴۸ کیلو دالتون و کمترین میزان پروتئین مایع فولیکولی در دو گروه سالم و بیمار مربوط به باند ۲۲۰ کیلو دالتون بود.

جدول ۳- مقایسه میانگین تغییرات (درصد) الگوی الکتروفورز پروتئین‌های مایع فولیکولی در دو گروه سالم و بیمار

وزن مولکولی (کیلو دالتون) / گروه	بیمار	سالم	سطح معنی‌داری
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
۲۲۰	۱/۴۸±۱/۳۰	۱/۰۴±۱/۲۶	۰/۹۱
۱۸۵-۲۲۰	۱/۳۵±۱/۶۸	۱/۲۰±۱/۶۸	۰/۶۹
۱۹۰	۲/۰۳±۴/۰۸	۰/۸۹±۲/۰۲	۰/۹۱
۱۲۵	۱/۸۹±۲/۳۵	۱/۵۷±۲/۵۱	۰/۷۸
۱۱۰	۳/۱۶±۲/۷۶	۳/۱۵±۳/۱۰	۰/۸۱
۷۵	۱۲/۱۲±۹/۸۰	۱۴/۰۵±۱۱/۵۳	۰/۷۰
۴۸-۷۵	۱۴/۰۷±۵۹/۵۰	۱۹/۲۱±۵۶/۳۱	۰/۵۸
۴۵	۳/۶۴±۹/۴۹	۳/۸۶±۹/۳۱	۰/۸۹
۴۰	۱/۳۷±۳/۲۸	۲/۷۷±۴/۳۳	۰/۱۶
۲۵-۳۰	۲/۵۵±۵/۷۲	۳/۱۲±۵/۵۰	۰/۸۲
۲۰-۲۵	۱/۱۴±۱/۹۵	۱/۳۱±۲/۱۷	۰/۶۱

بحث

طی مراحل رشد فولیکول‌ها، مایع فولیکولی که ترکیبات آن شامل فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و مواد مغذی مختلف می‌باشد، وضعیت لازم برای رشد و بلوغ اووسیت را فراهم می‌کند. مایع فولیکولی، منعکس کننده فعالیت-های بیوشیمیایی و هورمونی فولیکول‌ها در اندازه‌های متفاوت می‌باشد (۳۲).

در مطالعه حاضر در بررسی سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در گروه بیماران (زنان نازا) نسبت به گروه کنترل (زنان سالم) که توسط دو تست FRAP و DPPH انجام شد، با وجود اینکه در گروه افراد سالم میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بررسی شده با دو تست مذکور) بیشتر از گروه افراد بیمار بود، ولی این اختلاف بین دو گروه معنادار نبود. اویاوی و همکاران (۲۰۰۹) مطالعه‌ای در خصوص ارتباط بین مایع فولیکولی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP، ناباروری و نتایج اولیه تولید مثل در طول لقاح آزمایشگاهی (IVF) و همچنین ارتباط آنها با مورفولوژی تخمدان پلی‌کیستیک، سن و مصرف سیگار انجام دادند. آنها دریافتند که یک تعادل بین اکسیدان/آنتی‌اکسیدان در مایع فولیکولی برای بارداری در زنان تحت IVF نیاز است و یا به‌عبارتی تعادل آنتی‌اکسیدانی/پرواکسیدانی مایع فولیکولی مورد نیاز برای حاملگی در زنان تحت IVF مربوط به علل ناباروری، سن، وجود مورفولوژی تخمدان پلی‌کیستیک و سیگار کشیدن است (۳۳).

در مطالعه حاضر با اندازه‌گیری پروتئین تام، میانگین تغییرات این پروتئین در مایع فولیکولی دو گروه سالم و بیمار مقایسه شد که بر اساس نتایج، با توجه به اینکه میزان پروتئین تام در گروه افراد سالم نسبت به افراد بیمار بیشتر بود، ولی به خاطر اختلاف اندک بین دو گروه بیمار و سالم، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در مطالعه تاری و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی مقدار کوآنزیم Q10 در فولیکول و رابطه آن با باروری تخمک و درجه‌بندی جنین انجام شد و اندازه‌گیری میزان CoQ10 / پروتئین توسط روش برادفورد اندازه گردید، سطوح CoQ10 / پروتئین به‌طور قابل ملاحظه‌ای در اووسیت‌های بالغ افزایش یافته بود (۳۴). در مطالعه الکساندر و همکاران (۲۰۱۷)، غلظت کل پروتئین در مایع فولیکولی به‌دست آمده از فولیکول‌های کوچک (۴۵/۳±۳/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، فولیکول‌های متوسط (۴۴/۲±۳/۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و فولیکول‌های بزرگ (۴۵/۱±۲/۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) مشابه بود ($p>0/05$). در مطالعه آنها هیچ تغییری در غلظت کل پروتئین بین اندازه‌های مختلف فولیکول و هیچ‌گونه اختلافی در مقدار پروتئین در هر رده فولیکول (کوچک، متوسط و بزرگ) وجود نداشت (۳۵).

در مطالعه حاضر میانگین تغییرات میزان پراکسیداسیون لیپیدی مایع فولیکولی توسط MDA در دو گروه سالم و بیمار اندازه‌گیری شد که بر اساس نتایج به‌دست آمده، علی‌رغم وجود اختلاف بین دو گروه بیمار و سالم، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0/45$).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی نظیر گلوتاتیون ترانسفراز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در زنان جوان با کاهش ذخیره تخمک در مقایسه با ذخیره/پاسخ‌دهنده‌های بالای تخمک و اهداءکنندگان تخمک کاهش چشمگیری دارد. همچنین غلظت مایع فولیکولی از نشانگر استرس اکسیداتیو مالون دی آلدئید همراه با ۴ هیدروکسی آلکینال و اکسید نیتریک در زنان با کاهش ذخیره تخمک بیشتر از زنان با پاسخ زیاد تخمک و اهداءکنندگان تخمک می‌باشد (۳۶).

یالسینکایا و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند مالون دی آلدئید در زنان باردار و غیرباردار به‌طور معنی‌داری متفاوت است و در تشخیص حاملگی دارای حساسیت خوبی می‌باشد، در نتیجه MDA را به عنوان یک نشانگر برای پیش‌بینی IVF موفق پیشنهاد کردند (۳۷).

در این مطالعه همچنین الگوی تغییرات الکتروفورزی پروتئین‌های مایع فولیکولی در دو گروه سالم و بیمار مقایسه شد که بر اساس نتایج، با توجه به وجود اختلاف بین دو گروه بیمار و سالم، این تفاوت برای هیچ‌کدام از باندها معنی‌دار نبود. همچنین بیشترین میزان پروتئین مایع فولیکولی در دو گروه سالم و بیمار مربوط به باند ۷۵-۴۸ کیلو دالتون و کمترین میزان پروتئین مایع

فولیکولی در دو گروه سالم و بیمار مربوط به باند ۲۲۰ کیلو دالتون بود.

مطالعه ال شهات و همکار (۲۰۱۲) که بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در رابطه با اندازه فولیکول و مرحله از چرخه استروس (تولید هورمون‌های تولید مثلی) در گاومیش‌ها انجام شد، تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها همچون گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز را بررسی کردند. آنها همچنین میزان مالون دی‌آلدئید را به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی اندازه‌گیری نمودند و دریافتند که غلظت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، به‌جز کاتالاز، با توجه به اندازه فولیکول و مرحله چرخه استروسی متفاوت است که نشان‌دهنده نقش احتمالی آنها در روند رشد فولیکولار در طی چرخه استروس در بوفالوهاست (۲۴).

در مطالعه نصیری و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی وضعیت استرس اکسیداتیو در سرم و مایع فولیکولی زنان مبتلا به اندومتریوز انجام شد، زنان مبتلا به اندومتریوز دارای سطوح بالاتری از MDA (به عنوان ایندکسی از LPO) و سطوح پایین‌تری از TAC در سرم و مایع فولیکولی نسبت به گروه شاهد بودند و در نتیجه مایع فولیکولی زنان مبتلا به اندومتریوز موجب افزایش قدرت تکثیر سلول‌های آندومتر در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۲۷). در مطالعه جاوید و همکاران (۲۰۱۸) که بر روی شاخص‌های اسپرم مردان انجام شد، نشان داد که القاءکننده‌هایی که موجب بهبود شرایط آنتی‌اکسیدانی می‌شوند، در ارتقای فعالیت اسپرم و بهبود شرایط نقش مؤثری دارند (۳۸). همچنین سینگ و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای بر روی نشانگرهای استرس اکسیداتیو در مایع فولیکولی زنان مبتلا به اندومتریوز و ناباروری لوله‌ای تحت IVF دریافتند که TAC در مایع فولیکول زنان اندومتریوز نسبت به گروه شاهد کاهش نشان می‌دهد. علاوه بر آن کاهش معنی‌داری در میزان آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (SOD، کاتالاز، GPx و GR) نیز گزارش شد (۳۹). در مطالعه ییلماز و همکاران (۲۰۱۶) که سطوح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) بررسی شد، پارامترهای بالینی و آزمایشگاهی و سطح TAC مایع فولیکولی اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه نشان نداد (۴۰). اعظمیان جزی و همکاران (۲۰۱۷) ثابت کردند که ۶ هفته فعالیت بدنی موجب بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌گردد (۴۱). نانز کالونگ و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای که بر روی استرس اکسیداتیو در مایع فولیکولی از زنان جوان با پاسخ کم در مقایسه با اهداءکنندگان تخمک بارور انجام دادند، رابطه بین استرس اکسیداتیو، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مارکرهای التهابی را در مایع فولیکولی بررسی نمودند. در مطالعه آنها فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی همچون گلوتاتیون ترانسفراز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در زنان جوان با کاهش ذخیره تخمدان در مقایسه با گروه کنترل کاهش چشمگیری داشت (۳۶). در مطالعه پاسکوفسکی و همکاران (۱۹۹۵) که بر روی سلنیوم به‌عنوان بخشی از آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و محافظت از تمامیت ساختارهای غشایی که توسط تخریب آنزیمی پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای چربی داخلی و خارجی ایجاد می‌گردد، انجام شد، سطح سلنیوم مایع فولیکولی در زنان نابارور که تحت درمان IVF قرار گرفتند، اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، سطح سلنیوم و گلوتاتیون پراکسیداز در پایین‌ترین سطح نسبت به گروه کنترل بود که نشان‌دهنده کمبود میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در فولیکول تخمدان می‌باشد (۴۲). همچنین در مطالعه کاسکا و همکار (۲۰۰۹) با اندازه‌گیری MDA، SOD و NO در بیماران مبتلا به PCOS نسبت به افراد سالم، سطح MDA و فعالیت SOD در بیماران مبتلا به PCOS نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد، در صورتی‌که سطح NO تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۴۳). تعدادی از مطالعات به تأثیر بسیار زیاد آنتی‌اکسیدان‌ها و فعالیت ROS در مایع فولیکولی زنانی پرداخته‌اند که نیازمند درمان‌های کمک باروری هستند (۴۴، ۴۵)؛ این در حالی است که مطالعه حاضر نقش آنتی‌اکسیدان‌ها را به‌شدت ذکر شده در آن مقالات تأیید نمی‌نماید. هانگ و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای که انجام دادند، ضمن تأیید مجدد نقش مؤثر و مفید ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولی، سطحی حداقلی از قدرت

آنتی‌اکسیدانی برای موفقیت‌آمیز بودن کمک باروری پیشنهاد کردند (۴۶). به استناد مطالعات متعدد انجام یافته، بررسی ساختارهای پروتئینی و نسبت این پروتئین‌ها به یکدیگر و جداسازی پروتئین‌های ساختاری و واکنشگر، فضای وسیعی را در مطالعه ترکیب پروتئینی مایع فولیکولی پیش‌روی محققین می‌گشاید؛ به‌طوری‌که در مطالعه زاماه و همکاران (۲۰۱۵)، ۷۴۲ پروتئین از مایع فولیکولی اهداءکنندگان نرمال جداسازی شد که ۴۱۳ مورد از آن تاکنون گزارش نشده بود (۴۷). علاوه بر پروتئین‌ها، کنش متقابل پروتئین و ROS و همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانی، زمینه‌ای برای مطالعه بیشتر این تعداد زیاد پروتئین است، چنانچه تأثیر مستقیم pH و رادیکال‌های آزاد بر ساختارهای سوم و چهارم پروتئین‌ها و جایگاه فعال آنزیم‌ها مورد توجه محققین بوده است. در مورد الگوی الکتروفورزی نیاز به مطالعه دقیق‌تر با بکارگیری الکتروفورز دوبُعدی و پروتئومیکس مایع فولیکولی می‌باشد که از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اگرچه بین دو گروه زنان سالم و نازا از نظر پارامترهای پروتئین تام و شاخص‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف وجود داشت، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین در بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های مایع فولیکولی، تفاوتی مشاهده نشد. اگرچه برخی مطالعات انجام شده نیز با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشتند، ولی بیشتر مطالعات، بالا بودن استرس اکسیداتیو در زنان دارای اختلال تخمک‌گذاری را نشان داده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری پژوهشکده شمال انستیتو پاستور ایران و به‌خصوص زحمات آقای دکتر علی‌اصغر احمدی عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. B Bunting L, Boivin J. Knowledge about infertility risk factors, fertility myths and illusory benefits of healthy habits in young people. Hum Reprod 2008; 23(8):1858-64.
2. Anwar S, Anwar A. Infertility: a review on causes, treatment and management. Womens Health Gynecol 2016; 5(2):1-5.
3. Hruska KS, Furth PA, Seifer DB, Sharara FI, Flaws JA. Environmental factors in infertility. Clin Obstet Gynecol 2000; 43(4):821-9.
4. Tabatabaei S, Mamoei M, Aghaei A. Dynamics of ovarian follicular fluid in cattle. Comp Clin Pathol 2011; 20(6):591-5.
5. Kor NM, Moradi K. A review of biochemical metabolites concentration and hormonal composition of ovarian follicular fluid in domestic animals. Ann Res Rev Biol 2013; 3(3):246-55.
6. Hashemitabar M, Bahmanzadeh M, Mostafaie A, Orazizadeh M, Farimani M, Nikbakht R. A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between younger and older women with normal FSH levels. Int J Mol Sci 2014; 15(10):17518-40.
7. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. Int J Fertil Womens Med 2000; 45(5):314-20.
8. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. Reprod Biol Endocrinol 2012; 10(1):49.
9. Gupta S, Ghulmiyyah J, Sharma R, Halabi J, Agarwal A. Power of proteomics in linking oxidative stress and female infertility. BioMed Res Int 2014; 2014:916212.
10. Askoxylaki M, Siristatidis C, Chrelias C, Vogiatzi P, Creatsa M, Salamalekis G, et al. Reactive oxygen species in the follicular fluid of subfertile women undergoing in vitro fertilization: a short narrative review. J Endocrinol Invest 2013; 36(11):1117-20.
11. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2003; 79(4):829-43.
12. Maneesh M, Jayalekshmi H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. Indian J Clin Biochem 2006; 21(2):80-9.
13. Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. Glycobiology 2010; 21(4):401-9.

14. Luddi A, Capaldo A, Focarelli R, Gori M, Morgante G, Piomboni P, et al. Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF. Reprod Biol Endocrinol 2016; 14(1):57.
15. Prieto L, Quesada JF, Cambero O, Pacheco A, Pellicer A, Codoceo R, et al. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. Fertil Steril 2012; 98(1):126-30.
16. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7(1):40.
17. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. Drug Metab Rev 2006; 38(1-2):171-96.
18. Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. Theriogenology 2004; 61(2):329-35.
19. Hendriksen P, Steenweg W, Harkema J, Merton J, Bevers M, Vos P, et al. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology 2004; 61(5):909-20.
20. Lambrinoudaki IV, Augoulea A, Christodoulakos GE, Economou EV, Kaparos G, Kontoravdis A, et al. Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. Fertil Steril 2009; 91(1):46-50.
21. Gupta S, Choi A, Hope YY, Czerniak SM, Holick EA, Paolella LJ, et al. Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. Reprod Fertil Dev 2011; 23(5):673-80.
22. Oral O, Kutlu T, Aksoy E, Fıçıcıoğlu C, Uslu H, Tuğrul S. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. J Assist Reprod Genet 2006; 23(2):81-5.
23. Huang B, Li Z, Ai J, Zhu L, Li Y, Jin L, et al. Antioxidant capacity of follicular fluid from patients undergoing in vitro fertilization. Int J Clin Exp Pathol 2014; 7(5):2273-82.
24. El-Shahat K, Kandil M. Antioxidant capacity of follicular fluid in relation to follicular size and stage of estrous cycle in buffaloes. Theriogenology 2012; 77(8):1513-8.
25. Meijide S, Pérez-Ruiz I, Hernández ML, Navarro R, Ferrando M, Larreategui Z, et al. Paraoxonase activities in human follicular fluid: role in follicular maturation. Reprod Biomed Online 2017; 35(4):351-62.
26. Khosrowbeygi A, Ahmadvand H. Serum values of glutathione, paraoxonase and myeloperoxidase in women with gestational diabetes mellitus compared with normal pregnant women in Khorramabad during 2014-2015. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2017; 20(8):6-14. (Persian).
27. Nasiri N, Moini A, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Salman-Yazdi R, Arabipoor A. Oxidative stress statues in serum and follicular fluid of women with endometriosis. Cell J 2017; 18(4):582-7.
28. Wdowiak A. Comparing antioxidant enzyme levels in follicular fluid in ICSI-treated patients. Gynecol Obstet Fertil 2015; 43(7-8): 515-21.
29. Elizur SE, Lebovitz O, Orvieto R, Dor J, Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. Gynecol Endocrinol 2014; 30(10):705-7.
30. Kazemi A, Ramezanzadeh F, Nasr-Esfahani MH. The relations between dietary antioxidant vitamins intake and oxidative stress in follicular fluid and ART outcomes. Iran J Reprod Med 2015; 13(9):533-40.
31. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95(2):351-8.
32. Tabatabaei S, Mamoei M. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. Compar Clin Pathol 2011; 20(5):441-5
33. Oyawoye OA, Abdel-Gadir A, Garner A, Leonard AJ, Perrett C, Hardiman P. The interaction between follicular fluid total antioxidant capacity, infertility and early reproductive outcomes during in vitro fertilization. Redox Report 2009; 14(5):205-13.
34. Turi A, Giannubilo SR, Brugè F, Principi F, Battistoni S, Santoni F, et al. Coenzyme Q10 content in follicular fluid and its relationship with oocyte fertilization and embryo grading. Arch Gynecol Obstet 2012; 285(4):1173-6.
35. Alexandre R, Junior P, Mauricio F, Marina D, Renato A, Carlos H, et al. Proteomic analysis of follicular fluid from tropically-adapted goats. Anim Reprod Sci 2017; 188:35-44.
36. Nuñez-Calonge R, Cortés S, Gonzalez Gonzalez LM, Kireev R, Vara E, Ortega L, et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. Reprod Biomed Online 2016; 32(4):446-56.
37. Yalçınkaya E, Çakıroğlu Y, Doğer E, Budak Ö, Çekmen M, Çalışkan E. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. J Turk Ger Gynecol Assoc 2013; 14(3):136-41.
38. Javadi M, Gholaminejad F, Khadem Haghighian H, Karami AA, Alizadeh F. Effect of propolis oral supplements on sperm parameters and oxidative stress indicator in idiopathic infertile men: a double-blind randomized clinical trial. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2018; 21(8):1-8. (Persian).
39. Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. Reprod Toxicol 2013; 42:116-24.
40. Yilmaz N, Inal HA, Gorkem U, Sargin Oruc A, Yilmaz S, Turkkani A. Follicular fluid total antioxidant capacity levels in PCOS. J Obstet Gynaecol 2016; 36(5):654-7.

41. Azamian Jazi A, Emdi S, Hemati S. Effect of six weeks of continuous running on oxidative stress, lipid peroxidation and aerobic power in female survivors of breast cancer. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2017; 19(38):24-32. (Persian).
42. Paszkowski T, Traub A, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. Clin Chim Acta 1995; 236(2):173-80.
43. Kuşçu NK, Var A. Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non- obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome. Acta Obstet Gynecol Scand 2009; 88(5):612-7.
44. Jana SK, Babu N, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. Reprod Toxicol 2010; 29(4):447-51.
45. Hosseini S, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? J Assist Reprod Genet 2009; 26(6):355-64.
46. Huang B, Yang F, Dong X, Zheng Y, Tan H, Ai J, et al. Lower limit of antioxidant activity in follicular fluid: relationship to embryo quality in IVF cycle. Int J Clin Exp Med 2016; 9(8):16346-52.
47. Zamah AM, Hassis ME, Albertolle ME, Williams KE. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. Clin Proteomics 2015; 12(1):5.